

Untersuchungen zur Methylierung von Nucleinsäuren in der Rattenleber

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Peter Kahle

aus Leer/Ostfriesland

1973

Untersuchungen zur Beschaffenheit von
Nucleinsäuren in der Natur

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen zur Methylierung von Nucleinsäuren in der Rattenleber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von
Peter Kahle
aus Leer/Ostfriesland

1973

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Kröger

Koreferent: Prof. Dr. H. Möhrle

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 23. 11. 1973



Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Professor Dr. Dr. H. K r ö g e r im Biochemischen Institut der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br., und im Robert Koch-Institut, Berlin, angefertigt.

Ich danke Herrn Professor Dr. Dr. H. K r ö g e r für die guten Arbeitsbedingungen und für die stete Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. P. H o p p e - S e y l e r danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung eines Teils dieser Untersuchungen.

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht in:
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 1725 (1968)
Biochim. Biophys. Acta 240, 384 (1971)

I n h a l t s ü b e r s i c h t

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Synthese der Nucleinsäuren	1
1.2. RNA-Methylasen	4
1.3. Funktion der Methylierung	5
1.4. Methylasen und Regulation	6
1.5. Zum Inhalt der vorliegenden Arbeit	8
2. ORTE DER RNA-METHYLIERUNG	9
2.1. RNA-Synthese	9
2.2. RNA-Methylierung	10
2.2.1. Kinetik der Methylierung	10
2.2.2. Kontrollexperimente	12
2.2.2.1. Nucleasenbehandlung	12
2.2.2.2. Basen- und Nucleotidanalyse	12
2.2.2.3. Doppelmarkierung	13
2.2.2.4. Prüfung auf Ribosemethylierung	13
2.2.3. Gradientenzentrifugation der methylierten RNA.	14
2.3. Diskussion	17
3. EINFLUß VON DIÄTHYLNITROSAMIN AUF DIE RNA-METHYLIERUNG	18
3.1. RNA-Methylierung in vivo	19
3.1.1. RNA-Synthese	19
3.1.2. Kinetik der RNA-Methylierung	20
3.1.3. Gradientenzentrifugation der methylierten RNA.	21
3.1.4. Diskussion	21
3.2. Untersuchung der tRNA-Methylasen in vitro	24
3.2.1. Einfluß der DENA-Behandlung auf die Methylasen-aktivität	24
3.2.2. Spezifität der Methylasen	26
3.2.2.1. Zur Methode der Basenanalyse	26
3.2.2.2. Aktivität einzelner Methylasen in präcanceröser Leber	28
3.2.2.3. Aktivität einzelner Methylasen in tumoröser Leber	30

- II -

3.2.2.4.	Aktivität der Methylasen gegenüber homologer tRNA	30
3.2.3.	Diskussion	31
4.	LOKALISATION DER tRNA-METHYLASEN	35
4.1.	Methylasen in wäßrigen Kernpräparationen	35
4.2.	Methylasen in nichtwäßrigen Kernpräparationen ..	37
4.2.1.	Aktivität in verschiedenen Zellfraktionen ...	37
4.2.2.	Eigenschaften der Methylasen aus Zellkernen und Cytoplasma	38
4.2.2.1.	Substratspezifität und Optima von pH, Temperatur und Ionenstärke	39
4.2.2.2.	Basenspezifität	40
4.2.2.3.	Sequenzspezifität	40
4.2.2.4.	Gelchromatographie	41
4.3.	Diskussion	41
5.	WEITERE EIGENSCHAFTEN DER tRNA-METHYLASEN	44
5.1.	Einfluß der RNA-Konzentration auf den Methyleinbau	45
5.1.1.	RNA-Überschuß	45
5.1.2.	Begrenzende RNA-Konzentration	45
5.2.	Die MICHAELIS-Konstanten für beide Substrate ..	46
5.2.1.	Unfraktionierte tRNA	46
5.2.2.	S-Adenosyl-L-Methionin	48
5.3.	Die Verdünnungsinaktivierung der Methylasen ...	48
5.3.1.	Einfluß der Enzymkonzentration auf den Methyleinbau	48
5.3.2.	Mögliche Erklärung der Verdünnungsinaktivierung	50
5.3.3.	Schutz gegen enzymtoxische Verunreinigungen ..	50
5.4.	Stabilität der Methylasen	51
5.5.	Einfluß zweiwertiger Metallionen	53
5.6.	Methylierungsausmaß	54
5.6.1.	Methyleinbau mit der Zeit	54
5.6.2.	Maßnahmen gegen RNAseneinfluß	54
5.6.3.	Methyleinbau bei steigender Methylasen-konzentration	56
5.6.4.	Diskussion	57

5.7.	Methylasenaktivität bei Ratten verschiedenen Alters	58
5.8.	Einfluß des pH auf den Methyleinbau	59
5.9.	Aktivität der unfractionierten Methylasen gegenüber spezifischen tRNAs	61
5.9.1.	Bildung von 1-Methyladenin	62
5.9.2.	" " 5-Methylcytosin	63
5.9.3.	" " 1-Methylguanin	64
5.9.4.	" " 2-Methylguanin	64
5.9.5.	" " 2-Dimethylguanin	64
6.	CYTOSIN-5-METHYLASE	66
6.1.	Abtrennung des Enzyms von anderen tRNA-Methylasen	66
6.1.1.	Maßnahmen zum Schutz des Enzyms	66
6.1.2.	Ammoniumsulfatfällung	67
6.1.3.	Chromatographie auf TEAE-Cellulose	68
6.1.4.	" " Sephadex G 150	69
6.1.5.	Ergebnis	70
6.2.	Eigenschaften der Cytosin-5-Methylase	71
6.2.1.	Verdünnungsinaktivierung	71
6.2.2.	Zentrifugation der Cytosin-5-Methylase im Saccharosegradienten	72
6.2.3.	Methylierungsausmaß	74
6.2.4.	Aktivität der Cytosin-5-Methylase gegenüber spezifischen tRNAs	75
6.3.	Diskussion	77
7.	METHODEN	82
7.1.	pH-Messung	82
7.2.	Radioaktivitätsmessung	82
7.3.	Bestimmung von Protein nach LOWRY et al. (95) ..	82
7.4.	" " Ribose mit Orcin (96)	82
7.5.	" " Desoxyribose mit Diphenylamin (97) ..	82
7.6.	" " DNA und RNA in Gewebeproben	83
7.7.	Isolierung und Auftrennung von RNA	83
7.7.1.	Fraktionierte RNA-Isolierung nach GEORGIEV et al. (46)	84
7.7.2.	Gradientenzentrifugation von RNA	84

7.7.3.	Isolierung von tRNA aus Rattenleber nach DANIEL et al. (84)	84
7.7.4.	Reinigung von tRNA aus E. coli	85
7.7.5.	Isolierung von ribosomaler RNA aus E. coli nach BOLTON (101)	85
7.8.	Präparation von Zellfraktionen aus Rattenleber	86
7.8.1.	Herstellung von Homogenatüberstand aus Rattenleber	86
7.8.2.	Isolierung von Zellkernen und Cytoplasma nach SIMON et al. (36)	86
7.8.3.	Isolierung von Zellkernen nach BLOBEL et al. (72)	87
7.8.4.	Isolierung von Zellkernen nach MURAMATSU et al. (50)	87
7.8.5.	Nichtwäßrige Isolierung von Zellkernen nach SIEBERT (73)	87
7.8.6.	Extraktion von wäßrigen Zellkernen und nichtwäßrigen Präparationen	88
7.9.	Bestimmung der Methylasenaktivität	88
7.9.1.	Standardtest	88
7.9.2.	Kurztest	89
7.10.	Basen- und Nucleotidanalyse	89
7.10.1.	Basenanalyse nach Methylmarkierung in vivo ..	89
7.10.2.	Nucleotidanalyse nach Methylmarkierung in vivo (103)	89
7.10.3.	Basenanalyse nach Methylmarkierung in vitro .	90
7.10.4.	Basenauftrennung mit Dowex-Ionenaustauscher nach CRADDOCK (56)	91
7.10.5.	Prüfung auf Vollständigkeit der HClO ₄ -Hydrolyse	91
7.10.6.	Prüfung der Stabilität von 1-Methyladenin und 5-Methylcytosin	91
7.11.	Nucleasenbehandlung	91
7.12.	Prüfung auf Ribosemethylierung	92
7.13.	Elektrophoretische Reinigung von S-Adenosyl-L-Methionin nach HURWITZ (15)	92
7.14.	Carcinogenese mit Diäthylnitrosamin (DENA) ...	92
7.15.	Gelchromatographie der Methylasen nach BAGULEY et al. (23)	92

7.16.	Gradientenzentrifugation der Cytosin-5-Methylase	93
7.17.	Bestimmung der Alkoholdehydrogenase	93
8.	ZUSAMMENFASSUNG	94
9.	LITERATURVERZEICHNIS	97

A b k ü r z u n g e n

CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DENA	Diäthylnitrosamin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure (eingesetzt als Dinatriumsalz)
g	Im Zusammenhang mit Zentrifugation: Erdbeschleunigung. Angegeben sind die im Zentrifugenröhrchen maximal auftretenden Beschleunigungen
IpM	Impulse pro Minute
NAD (NADH)	Oxydierte (reduzierte) Form von Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid
1mA	1-Methyladenin
5mC	5-Methylcytosin
1mG	1-Methylguanin
2mG	N ² -Methylguanin
2mmG	N ² -Dimethylguanin
7mG	7-Methylguanin
5mU (T)	5-Methyluracil (Thymin)
OD	Optische Dichte (Extinktion). Eine OD ₂₆₀ -Einheit ist die Menge einer Substanz, die zu 1 ml gelöst in Küvetten von 1 cm Lichtweg bei 260 nm Wellenlänge die Extinktion 1,0 hat.
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	Messenger-RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	Transfer-RNA
tRNA ^{Trp} _{B.stearoth.}	für Tryptophan spezifische tRNA aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>
s	Sedimentationskoeffizient
SAH	S-Adenosyl-L-Methionin
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UpM	Umdrehung pro Minute
Vol.	Volumenteile

1. EINLEITUNG

1.1. Synthese der Nucleinsäuren

RNA-Moleküle entstehen durch enzymatische Verbindung der Nucleotide Adenosin-, Cytidin-, Guanosin- und Uridinphosphat. Der Vorgang läuft an der DNA so ab, daß die Reihenfolge der Nucleotide in der RNA der eines Stranges der DNA entspricht.

Die so entstandenen Polynucleotide bilden noch nicht die fertige RNA. Vielmehr wird die Mehrzahl von ihnen noch modifiziert. Zu dieser Modifikation gehört das "Zurechtschneiden" überlanger Vorstufen (Übersicht 1). Höhermolekulare Vorstufen wurden für die Transfer-RNA (tRNA) (2, 3), für ribosomale RNA (rRNA) und für Messenger-RNA (mRNA) (4) gefunden.

Besonders die Fertigstellung von rRNA aus Säugetierzellen ist gut bekannt (5). Danach wird eine Vorstufe mit einer Sedimentationskonstante von 45s schrittweise verkürzt, gespalten und die Bruchstücke wieder verkürzt bis zu den ribosomalen RNAs mit 18s, 28s und 7s (siehe Abb. 1). Schon die 45s-Vorstufe ist mit ribosomalem Protein beladen. Die Komplexe der fertigen rRNA mit Protein wandern als Ribosomen-Untereinheiten aus dem Zellkern in das Cytoplasma.

Zur Modifikation gehört weiter die Bildung sogenannter "seltener" Nucleoside, die in der RNA aller Organismen vorkommen. Neben Pseudo- und Dihydrouridin sind es vor allem die Methylderivate der 4 Hauptnucleoside. Man findet methylierte Ribose und eine ganze Reihe methylierter Basen. Die bislang bekannt gewordenen Methylbasen zeigt Abb. 2. Den größten Teil dieser Methyl-

basen enthält die tRNA: Bei E. coli sind etwa 2 Mol % (7), bei Säugetieren etwa 6 Mol % (8) aller Basen methyliert. Ebenfalls methyliert ist die rRNA: Bei E. coli sind es 0,5 Mol % (7, 9), bei Säugetieren etwa 0,75 Mol % (10, 11) aller Basen. Die Boten- oder mRNA enthält dagegen, soweit man weiß, keine Methylgruppen (12).

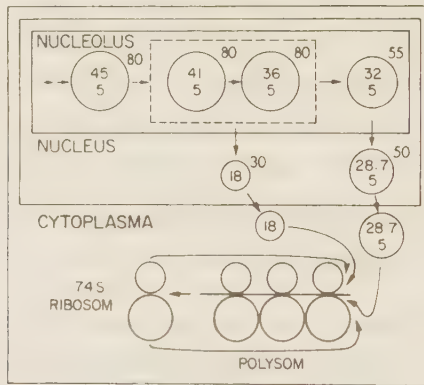
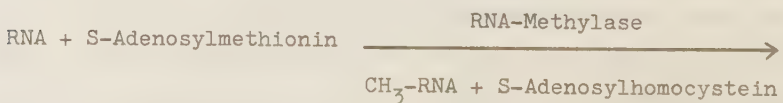


Abb. 1 Bildung von Ribosomen bei Säugetieren nach MADEN (6). Die Zahlen in den Kreisen bedeuten die Sedimentationskonstanten der RNAs, die Zahlen außerhalb der Kreise die der Ribonucleoproteinkomplexe.

Methylbasen und Methylribose werden nicht als solche in die RNA eingebaut, sondern durch nachträgliche Methylierung des Polynucleotids gebildet (13). Methylendonator in der enzymkatalysierten Reaktion ist "aktives Methionin", das S-Adenosylmethionin. Die Reaktionsgleichung lautet:



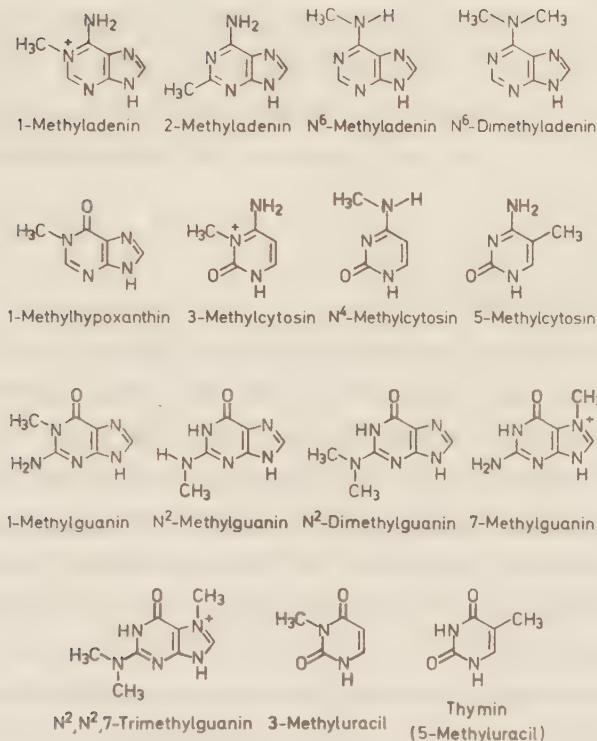


Abb. 2 Methylbasen, die in RNA gefunden wurden.

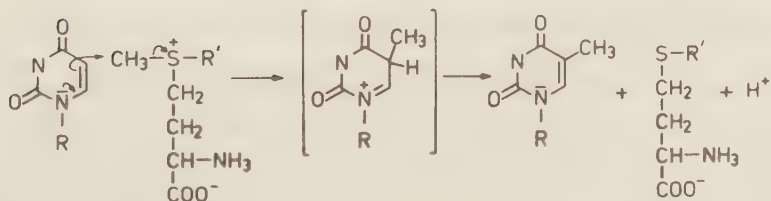


Abb. 3 Mechanismus der enzymatischen Methylierung nach BOREK und SRINIVASAN (14).

Nach BOREK (14) ist der Reaktionsmechanismus folgendermaßen vorzustellen (Abb. 3): Es wird ein positives Methyl-Ion auf Positionen übertragen, an denen wegen eines einsamen Elektronenpaares oder aus Mesomeriegründen eine erhöhte negative Ladung auftritt.

1.2. RNA-Methylasen

Wie bei der Unterschiedlichkeit der methylierten Positionen zu erwarten, wurde eine ganze Reihe verschiedener RNA-Methylasen gefunden. GOLD und HURWITZ isolierten aus *E. coli* 6 verschiedene tRNA-Methylasen (15) und 5 verschiedene rRNA-Methylasen (16). BJÖRK und SVENSSON fanden in Hefe 8 tRNA-Methylasen (17). Man muß annehmen, daß es für die Bildung jeder Art von Methylbasen mindestens eine Methylase gibt. Mehrere Enzyme zur Bildung der gleichen Methylbase gibt es anscheinend dann, wenn diese Base an verschiedenen Positionen eines RNA-Moleküls gebildet werden soll (18). Um von einer Methylase als methylierbar erkannt zu werden, muß eine RNA eine bestimmte Base, z. B. Guanin, in einer bestimmten Position haben. In einigen Fällen muß diese Base in einer bestimmten Sequenz von Nachbarbasen stehen (18, 19). Zur Erkennung der entsprechenden Position dient dem Enzym die Tertiärstruktur der RNA (18, 20, 21).

Die Menge an noch nicht methylierten Vorstufen der fertigen RNA ist bei den untersuchten Organismen äußerst klein. tRNA-Vorstufen waren in Säugetierzellen nur nach Isotopenmarkierung (2), bei normalen Colibakterien überhaupt nicht nachweisbar (3). Die methylierte RNA ist aber kein Substrat mehr für die methylierenden Enzyme desselben Organismus (22). Der erste Nachweis

der Methylasen gelang daher nur, weil eine Mutante von *E. coli* bekannt war, in der sich unter Methioninmangel methylarme RNA anreichert. Diese methylarme RNA war das gesuchte Substrat für RNA-Methylasen (14).

Die tRNAs anderer Bakterien und höherer Organismen werden von den *E. coli*-Methylasen auch dann methyliert, wenn sie unter normalen Bedingungen synthetisiert wurden. Der Grund dafür ist die "Species-Spezifität" der Methylasen: Die Methylasen einer Species methylieren nur für diese Species charakteristische Positionen einer tRNA. Methylasen anderer Species finden also noch Positionen für eine zusätzliche Methylierung. Die Spezifitätsunterschiede sind unter Bakterien und zwischen Bakterien und höheren Organismen groß. Sie sind gering unter Eucaryoten. Rattenmethylasen z.B. methylieren Hefe-tRNA in weit geringerem Umfang als *E. coli*-tRNA und können auf die tRNA anderer Säugtiere fast überhaupt keine Methylgruppen übertragen (14, 23, 24).

1.3. Funktion der Methylierung

Trotz zahlreicher Experimente ist über die Funktion der Methylbasen in RNA wenig bekannt. Bei der rRNA hängt die Methylierung eng mit der Fertigstellung der Ribosomen zusammen (Übersicht 12). Methyliert wird an der 45s-Vorstufe nur der Teil, der bei der schrittweisen Verkürzung bis zur 28s- und 18s-RNA erhalten bleibt (25). Es wird diskutiert, daß a) die Methylierung der rRNA einen Schutz vor Nucleasen bietet (6), b) die Methylierung ein Signal für die Vorstufenspaltung ist (1), c) die Methylgruppen für die endgültige Konformation der rRNA wichtig sind (12). Schlüssige Experimente gibt es für

diese Vorstellungen nicht. Es dürften nicht alle Methylgruppen auf der rRNA lebensnotwendig sein, denn es wurden sowohl von Hefe (26) wie von E. coli (27) Mutanten isoliert, denen einzelne Methylbasen fehlten.

Es sind aus Bakterien spezifische tRNAs rein isoliert worden, denen einzelne oder auch alle Methylgruppen fehlten. Die bekannten Funktionen der tRNA wurden in vitro geprüft: Beladung mit Aminosäuren, Erkennung des entsprechenden Codontripletts, Bindung an Ribosomen, alles zusammen in der Proteinsynthese in vitro. Beim Fehlen aller Methylgruppen waren diese Reaktionen verlangsamt, ohne aber qualitativ verändert zu sein (28 - 30). Proteine, die mit solcher tRNA in vitro hergestellt wurden, hatten die normalerweise zu erwartende Aminosäure-Sequenz (28).

Ausfall der Uracilmethylierung, die in der gleichen Position bei allen bisher bekannten tRNA-Sequenzen erfolgt, hatte auf in vitro-Tests überhaupt keinen Einfluß, beeinträchtigte aber die Überlebensfähigkeit von Bakterien trotzdem (31).

Eine klare Veränderung ergab nur der Ausfall der Modifikation der Base neben dem Anticodon. Hier war ausschließlich die Bindung an das Ribosom geschwächt (32). So muß man damit rechnen, daß jede einzelne Modifikation einen eigenen Sinn hat. Dieses wird man aber vermutlich erst dann herausbekommen, wenn man weitere Funktionen von rRNA und tRNA kennt und sie überprüfen kann.

1.4. Methylasen und Regulation

Eine vermutete weitere Funktion der tRNA ist die Teilnahme an Regulationsvorgängen, speziell der Proteinsynthese. In diesem

Zusammenhang ist es auffällig, daß Veränderungen der Aktivität tRNA-methylierender Enzyme gerade bei Differenzierungsvorgängen gefunden wurden.

Bei der Umwandlung des amöboiden Stadiums von Dictyostelium zum Fruchtkörper fiel die Methylasenaktivität auf $1/4$ (33). Ein starker Anstieg wurde bei Insekten während der Verpuppungszeit gefunden (34). Thyroxin bewirkte bei Froschlarven einen starken Abfall der Methylasen (35). Bei Säugetierembryonen findet man sehr hohe Methylasenspiegel, die schon zur Zeit der Geburt abfallen, beim Jungtier aber immer noch höher sind als beim ausgewachsenen Tier (36, 37).

Zwar fand TURKINGTON, daß bei differenzierendem Mäusebrustdrüsenepithel die steigende tRNA-Methylasenaktivität nur der erhöhten tRNA-Synthese genau folgte (38), doch wurde auch von Fällen berichtet, wo die Methylasenaktivität sich unabhängig von der tRNA-Synthese veränderte. TURKINGTON und RIDDLE (39) stellten fest, daß die einzelnen tRNA-Methylasen unabhängig voneinander veränderbar sind.

In keinem Fall konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen Wachstums- oder Differenzierungsvorgängen und Veränderungen der Aktivität der Methylasen gefunden werden. Auch steht noch nicht fest, ob erhöhte Methylasenaktivität in vivo ein erhöhtes Methylierungsausmaß bewirkt, wie es in vitro gefunden wurde. Gerade die Tatsache, daß Methylasen einzeln regulierbar sind, rechtfertigt jedoch die Annahme, daß sie mehr bewirken als nur die notwendige Fertigstellung von tRNAs.

Besondere Aufmerksamkeit haben die RNA-Methylierung bzw. die

tRNA-Methylasen gefunden, nachdem in Tumor-tRNA ein erhöhter Gehalt an Methylbasen festgestellt wurde (40, 41) und auch die tRNA-Methylasenaktivität in Tumorgeweben einen viel höheren Wert hatte als die aus vergleichbarem Normalgewebe (42). Obwohl auch hier ein kausaler Zusammenhang nicht nachgewiesen ist, wurde vermutet, erhöhte "falsche" Methylierung könnte in der Zelle zu Fehlregulationen und damit schließlich zum Tumor führen (Übersicht 43).

1.5. Zum Inhalt der vorliegenden Arbeit

Anlaß der vorliegenden Arbeit waren die Berichte über erhöhte RNA-Methylierung in tumorösem Gewebe. Es sollte geprüft werden, ob schon während der Carcinogenese Veränderungen im Ablauf der Methylierung feststellbar sind. Dazu wurde die Methylierung zunächst in normaler Rattenleber untersucht, dann unter dem Einfluß des Carcinogens Diäthylnitrosamin. Anschließend wurde nach Veränderungen der tRNA-Methylasen in präcanceröser und tumoröser Leber gesucht. Es folgte eine nähere Charakterisierung dieser Enzyme aus normalem Gewebe und ihre Lokalisation innerhalb der Zelle. Zuletzt wurde eines dieser Enzyme angereichert und einige seiner Eigenschaften beschrieben.

2. ORTE DER RNA-METHYLIERUNG

Im ersten Teil dieser Arbeit wird untersucht, wo in der Rattenleberzelle RNA methyliert wird. Entsprechende Versuche sind bereits an Zellkulturen gemacht worden (44, 45). Diese Zellkulturen sind experimentell leichter zugänglich, geben aber möglicherweise nicht die Verhältnisse in der gesunden Säugerzelle wieder, da sie von Tumorzellen abgeleitet sind.

Die Untersuchung bestand im Prinzip darin, daß Ratten radioaktiv markiertes Methionin injiziert und zu verschiedenen Zeiten danach die RNA nach GEORGIEV isoliert und auf ihren Gehalt an Methylgruppen analysiert wurde. Bei dem Verfahren von GEORGIEV (46, 47) wird Leberhomogenat bei verschiedenen Temperaturen mit Phenol und Puffer extrahiert. Bei 4° gewinnt man die gesamte cytoplasmatische RNA und die im Nucleoplasma gelöste RNA, zusammen über 95 % der zellulären RNA (47). Mit der 50°-Extraktion wird die im Kern gebundene ribosomale RNA und ihre Vorstufen freigesetzt und die 65°-Fraktion besteht aus RNA mit einem DNA-ähnlichen Basenverhältnis, sie enthält also vor allem die im Kern gebundene mRNA und ihre Vorstufen. DNA wird bei diesem Extraktionsverfahren kaum freigesetzt.

2.1. RNA-Synthese

Vor den Methylierungsexperimenten wurde die RNA-Synthese untersucht. Den Ratten wurde ^{14}C -Orotsäure, eine Vorstufe der Pyrimidinbasen, injiziert und zu verschiedenen Zeiten danach wurde die RNA in Fraktionen isoliert. Abb. 4 zeigt die RNA-Synthesegeschwindigkeiten relativ zur RNA-Menge der Fraktionen. Man sieht bei den im Kern gebundenen RNAs, besonders bei

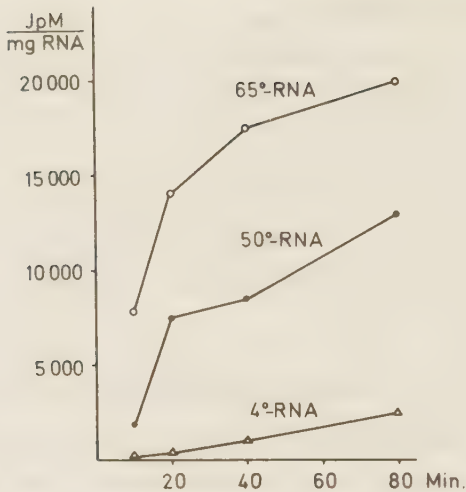


Abb. 4 Spezifische Radioaktivität der RNA-Fractionen nach Injektion von (6- ^{14}C)-Orotsäure. Die Tiere erhielten intravenös 2 μCi Orotsäure pro 100 g Körpergewicht und wurden zu den angegebenen Zeiten getötet. Die Werte sind Mittelwerte aus 2 Versuchen mit je 2 Tieren.

der DNA-ähnlichen RNA, einen raschen Anstieg. Die Radioaktivität der 4° -RNA steigt dagegen langsam und mit einer Verzögerung. Die Kurven spiegeln den raschen Umsatz der mRNA im Kern und der an ihren Produktionsort gebundenen rRNA gegenüber dem langsamen Umsatz der Masse der stabileren rRNA und tRNA im Cytoplasma.

2.2. RNA-Methylierung

2.2.1. Kinetik der Methylierung

Injiziert man Ratten ^3H -Methionin und isoliert zu verschiedenen Zeiten danach die RNA, findet man in der 4° -Fraktion eine

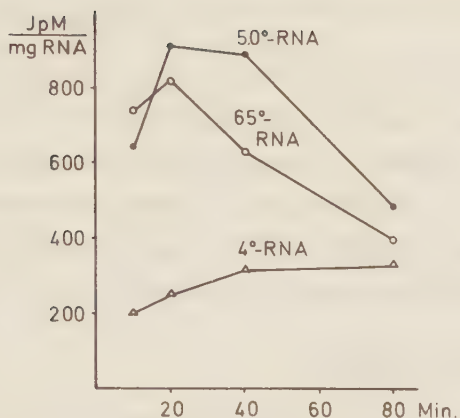


Abb. 5 Spezifische Radioaktivität der RNA-Fractionen nach Injektion von (Methyl- ^3H)-L-Methionin. Die Tiere erhielten intravenös 50 μCi Methionin pro 100 g Körpergewicht und wurden zu den angegebenen Zeiten getötet. Die Werte sind Mittelwerte aus 2 Versuchen mit je 2 Tieren.

stetige Zunahme der spezifischen Radioaktivität bis zu einem Plateauwert, in der 50°- und 65°-Fraktion dagegen nach raschem Anstieg einen Abfall (Abb. 5).

Der Abfall der 50°- und 65°-Kurven hat zwei Gründe: a) das injizierte radioaktive Methionin ist verbraucht. Es ist schneller verbraucht als die im vorigen Experiment injizierte Orotsäure, die auch nach 80 min noch die Radioaktivität der beiden kerngebundenen Fraktionen verstärkt. b) Erschöpfung des ^3H -Methioninvorrates allein würde nur zu einem Plateau in der Kurve, nicht zu einem Abfall führen. Dieses Absinken weist auf das Verschwinden der gerade methylierten RNA aus ihrer Position im Zellkern hin, sei es durch Abbau oder Verlagerung. Tatsäch-

lich wird ja die ribosomale RNA nach ihrer Synthese ins Cytoplasma gebracht (Abb. 1).

Es ist nichtklar, worauf die Radioaktivität in der 65° -Fraktion beruht. Bei mRNA ist bislang keine Methylierung beobachtet worden (12). Es handelt sich demnach um weitere ribosomale RNA (-Vorstufen), die bei 50° nicht mehr eluiert werden, oder um bislang unbekannte methylierte RNA-Species.

2.2.2. Kontrollexperimente

Um zu überprüfen, ob die angewandten Methoden zur Messung der RNA-Methylierung geeignet sind, wurden einige Kontrollexperimente durchgeführt.

2.2.2.1. Nucleasenbehandlung

Die RNA wurde mit RNase und mit DNase behandelt und anschließend mit Trichloressigsäure gefällt. DNase hatte keinen Einfluß auf die Fällbarkeit der radioaktiven Substanz. RNase führte dagegen zum Verschwinden des radioaktiven Niederschlages. Die Radioaktivität war also in der RNA und beruhte nicht auf mitgeschleppten Verunreinigungen.

2.2.2.2. Basen- und Nucleotidanalyse

Um auszuschließen, daß im Purinskelett radioaktiv markierte Hauptbasen eine Methylierung vortäuschen, wurde mit Perchlorsäure bzw. Alkali hydrolysiert und die Basen durch Papierchromatographie, bzw. die Nucleotide auf Dünnschichtplatten durch Elektrophorese und Chromatographie aufgetrennt. Im Gebiet der Hauptbasen wurde keine Radioaktivität gefunden.

2.2.2.3. Doppelmarkierung

Wegen der Möglichkeit, daß die tritierte Methylgruppe vor der Übertragung auf die RNA durch Wasserstoffaustausch an Radioaktivität verliert, wurde ein Doppelmarkierungsexperiment gemacht. Eine Mischung von ^{14}C - und ^3H -markiertem Methionin wurde injiziert. Das Radioaktivitätsverhältnis in der isolierten RNA entsprach fast dem der injizierten Lösung. Der Quotient $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ betrug bei der Lösung 2,3, bei der RNA im Durchschnitt 2,1 (Tab. 1).

Tab. 1 Einbauverhältnis von Radioaktivität aus ^3H - und ^{14}C -markierten Methylgruppen in den RNA-Fractionen. Den Tieren wurden pro 100 g Körpergewicht 40 μCi (Methyl- ^3H)-L-Methionin und 10 μCi (Methyl- ^{14}C)-L-Methionin injiziert. Zu jedem Versuch wurden 2 Tiere eingesetzt.

Zeit nach Methionin- Injektion (min)	RNA-Fraktion	^3H (IpM/mg RNA)	^{14}C (IpM/mg RNA)	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
20	4^{O} -RNA	146	66	2,20
	50^{O} -RNA	740	381	1,94
	65^{O} -RNA	720	313	2,29
80	4^{O} -RNA	192	93	2,05
	50^{O} -RNA	528	254	2,08
	65^{O} -RNA	389	180	2,16

2.2.2.4. Prüfung auf Ribosemethylierung

Schließlich wurde untersucht, wie groß der Anteil der Ribosemethylierung an der Radioaktivität war. BROWN und ATTARDI fanden nach Perchlorsäurehydrolyse bis zu 76 % der Radioaktivität

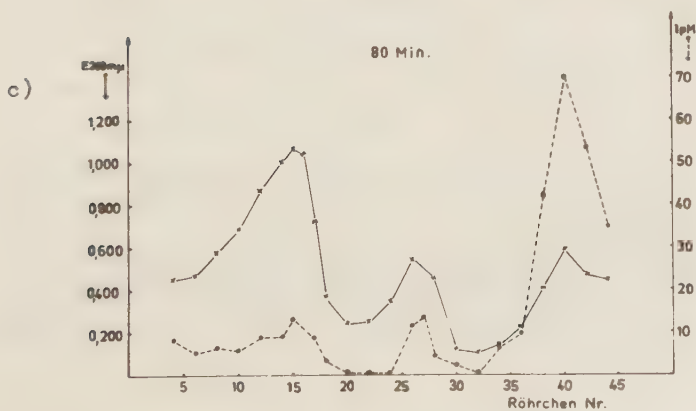
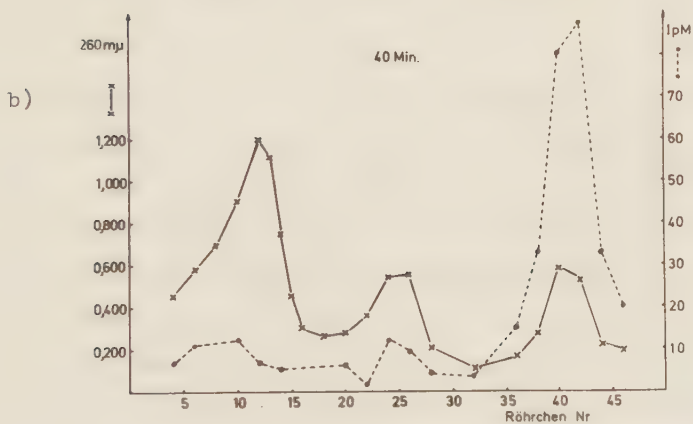
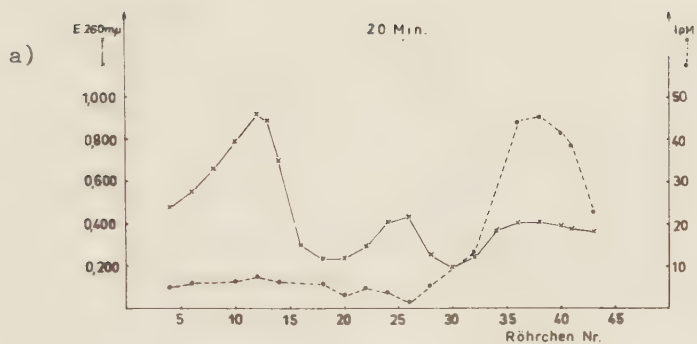
in dem Verkohlungsprodukt, das abzentrifugierbar ist und die Ribose der RNA in polymerisierter Form enthält (11). Die RNA aus Rattenleber wurde hydrolysiert und nach Zusatz von Wasser das Verkohlungsprodukt abzentrifugiert. Der Überstand enthielt 96 % der eingesetzten Radioaktivität.

2.2.3. Gradientenzentrifugation der methylierten RNA

4° -RNA und 50° -RNA wurden durch Zentrifugation im Saccharosegradienten nach Molekulargewicht aufgetrennt. Man findet nach Fraktionierung der Gradienten bei der 4° -RNA drei Gipfel optischer Dichte: die 28s und 18s ribosomale RNA und die tRNA (Abb. 6). 20 min nach Injektion des ^3H -Methionin läßt sich Radioaktivität nur in der tRNA nachweisen. Nach 40 min hat die Aktivität dieser Fraktion noch zugenommen. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die rRNA markiert, ihre Markierung wird 80 min nach Injektion noch deutlicher.

Auftrennung der 50° -RNA im Saccharosegradienten ergibt 2 Gipfel optischer Dichte (Abb. 7): die beiden rRNAs mit 28s und 18s. Radioaktivität findet man 20 min nach Injektion in einer schweren Fraktion, die im wesentlichen 45s entspricht. Nach 40 min ist die Hauptradioaktivität im Bereich von etwa 32s nachweisbar. Nach 80 min liegt sie in den beiden ribosomalen Gipfeln.

Abb. 6 Zonengradienten-Zentrifugation der 4° -Fraktion (je 40 OD₂₆₀-Einheiten) aus normaler Leber nach Injektion von (Methyl- ^3H)-L-Methionin.
Die Tiere erhielten intravenös 200 μCi Methionin pro 100 g Körpergewicht und wurden zu den angegebenen Zeiten getötet: a) 20 min, b) 40 min, c) 80 min nach Injektion.



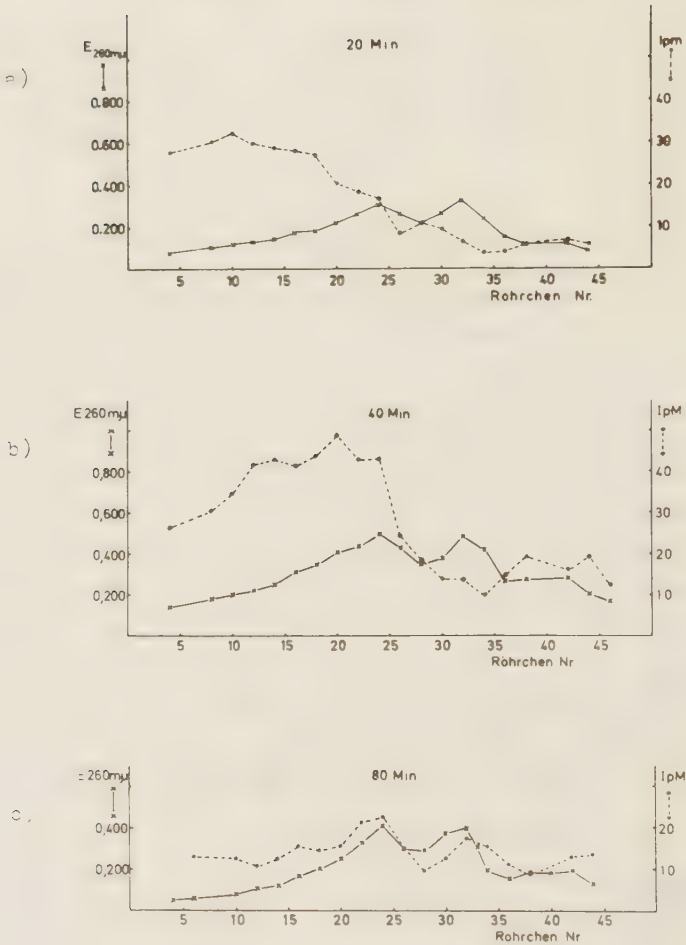


Abb. 7 Zonengradienten-Zentrifugation der 50⁰-Fraktion aus normaler Leber nach Injektion von (Methyl-³H)-L-Methionin.
Die Tiere erhielten intravenös 200 μ Ci Methionin pro 100 g Körpergewicht und wurden zu den angegebenen Zeiten getötet: a) 20 min, b) 40 min, c) 80 min. Eingesetzte Mengen: a) 23, 4 b) 32,6 c) 13,6 OD₂₆₀-Einheiten.

2.3. Diskussion

Diese Ergebnisse von normaler Rattenleber stimmen mit den Beobachtungen von GREENBERG und PENMAN an Hela-Zellen überein. Danach erfolgt die Methylierung der rRNA im Nucleolus an der 45s Vorstufe (45) und nicht, wie vorher angenommen, an der 35s RNA (44, 48). Die Diagramme zeigen, wie die 45s RNA zur 18s und, über die 32s Zwischenstufe, zur 28s rRNA abgebaut wird, welche dann gemäß dem Schema (Abb. 1) ins Cytoplasma wandert. Diese Befunde wurden durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (49, 50).

Im Gegensatz zur rRNA taucht methylierte tRNA sofort in der 4° -Fraktion auf. Man findet auch keine entsprechende markierte RNA bei der kerngebundenen RNA. tRNA ist also während der Methylierung nicht an die Kernstruktur gebunden. Die Fraktionierungsmethode nach GEORGIEV erlaubt jedoch keine räumliche Differenzierung zwischen Cytoplasma und Nucleoplasma. Andere Autoren haben nach entsprechender Methylierungszeit Zellkerne und Cytoplasma getrennt isoliert und aus beidem die RNA gewonnen. Als Ergebnis wurde das Cytoplasma als hauptsächlicher Ort der tRNA-Methylierung angegeben, mit der Einschränkung, daß bei der Kernisolierung ein Teil der löslichen Substanzen ins Cytoplasma gespült worden sein könnte (50, 51). Inzwischen wurden im Cytoplasma auch untermethylierte Vorstufen der tRNA gefunden (51).

3. EINFLUSS VON DIÄTHYLNITROSAMIN AUF DIE RNA-METHYLIERUNG

Nach Analyse der Methylierung von RNA in normaler Rattenleber wurde untersucht, ob im Frühstadium der Carcinogenese eine Veränderung der Methylierung feststellbar ist. Veränderungen wären denkbar, wenn eine qualitativ oder quantitativ veränderte Methylasenaktivität an der Krebsentstehung beteiligt ist. Zur Klärung dieser Frage wurden a) die unter 2. beschriebenen Experimente an präcancerösen Rattenlebern wiederholt und b) der Einfluß des Carcinogens auf die tRNA-Methylasen in vitro untersucht.

Als Carcinogen wurde den Ratten pro Tag und kg Gewicht 4 mg Diäthylnitrosamin (DENA) mit dem Trinkwasser verabreicht. Soweit nicht anders angegeben, dauerte die Behandlung 30 Tage. Die Einzelmenge von 4 mg/kg entspricht 1,5 % der akut letalen Dosis und führt, täglich gegeben, bei Ratten nach 140 - 150 Tagen mit großer Sicherheit zum Lebertumor (52). Cytologische Veränderungen sind jedoch schon nach wenigen Tagen zu beobachten (53, 54).

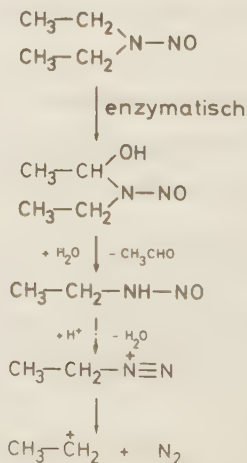


Abb. 8

Abbau und "Giftung" von Diäthylnitrosamin nach DRUCKREY et al. (52).

Abb. 8 zeigt die Formel und den vermutlichen Abbau der Substanz. Die Bildung eines alkylierenden Carbeniumkations ist nach DRUCKREY (52) von einem enzymatischen Hydroxylierungsschritt abhängig, so daß Tumoren sich nur in solchen Organen bilden können, die das entsprechende Enzym haben. Das alkylierende Kation bindet sich an Nucleinsäuren und Proteine (55). Der Mechanismus der Carcinogenese ist unbekannt.

3.1. RNA-Methylierung in vivo

3.1.1. RNA-Synthese

Zunächst wurde untersucht, ob unter DENA die RNA-Synthese selbst beeinflußt ist. Gemessen wurde die Synthese wieder am Einbau markierter Orotsäure. Tab. 2 zeigt den Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Nach 30 Tagen DENA ist die RNA-Synthese in der Rattenleber vermindert. Die Dif-

Tab. 2 Einbau von (6-¹⁴C)-Orotsäure in RNA in normaler und präcanceröser Leber.
Die Tiere erhielten intraperitoneal 2 µCi Orotsäure/100 g Körpergewicht und wurden zu den angegebenen Zeiten getötet. Zu jedem Versuch wurden 4 Tiere eingesetzt.

	Zeit nach Orotsäure-Gabe (min)	4°-Frakt. (IpM/mg RNA)	50°-Frakt. (IpM/mg RNA)
Normal-Tiere	15	337	7 750
	40	1 470	21 400
DENA-behandelte Tiere (30 Tage Fütterung)	15	282	4 820
	40	1 168	10 750

ferenz ist bei der 4^0 -Fraktion nicht so deutlich, beträgt aber bei der kerngebundenen rRNA 40 - 50 %.

3.1.2. Kinetik der RNA-Methylierung

Wie bei den vorigen Versuchen wurde den Ratten ^3H -Methionin injiziert und zu verschiedenen Zeiten danach die RNA in Fraktionen isoliert. Wie aus Abb. 9 hervorgeht, ist der Einfluß der carcinogenen Substanz nur gering. Der Einbau radioaktiver Methylgruppen ist bei 4^0 -RNA praktisch unverändert.

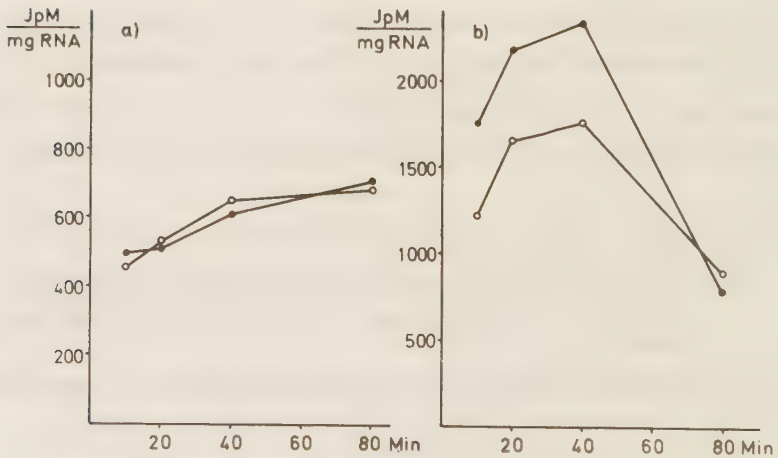


Abb. 9 Spezifische Radioaktivität der RNA-Fractionen aus normaler und präcanceröser Leber nach Injektion von (Methyl- ^3H)-L-Methionin.

●—● normale Leber

○—○ präcanceröse Leber (30 Tage Fütterung von DENA)

a) 4^0 -Fraktion b) 50^0 -Fraktion

Die Tiere erhielten intravenös 100 μCi Methionin pro 100 g Körpergewicht und wurden zu den entsprechenden Zeiten getötet. Angegeben sind die Mittelwerte aus 2 - 3 Versuchen mit je 2 Tieren.

Bei der kerngebundenen rRNA dagegen ist der Einbau um 30 % verringert. Dieser Unterschied ist 80 min nach Injektion ausgeglichen, zu einem Zeitpunkt also, wo ein Großteil der Radioaktivität ins Cytoplasma transferiert ist.

3.1.3. Gradientenzentrifugation der methylierten RNA

Um zu sehen, ob die Methylierung einer bestimmten rRNA beeinflusst ist, wurden die 4° -RNA und 50° -RNA durch Gradientenzentrifugation aufgetrennt. Die 4° -RNA aus präcanceröser Leber zeigte keinerlei Unterschiede gegenüber normaler RNA, auch nicht in den beiden ribosomalen Gipfeln (Abb. 10).

Bei der 50° -RNA (Abb. 11) aus präcanceröser Leber sieht man nach Zonenzentrifugation eine gleichmäßige Reduktion der Methylierung, wenn man das Verhältnis von Radioaktivität zu optischer Dichte mit dem Diagramm von normaler 50° -RNA vergleicht. Im weiteren Verlauf verschiebt sich die Radioaktivität genau wie bei normaler Leber in Richtung der beiden ribosomalen Gipfel 28s und 18s. Keine der beiden Komponenten ist besonders betroffen.

3.1.4. Diskussion

Die RNA-Methylierung in vivo wurde unter Carcinogeneinfluß beobachtet. Bei der Cytoplasma-RNA (4° -RNA) fand sich keine Veränderung, tRNA und rRNA wurden methyliert wie die RNAs aus normalen Tieren. Bei der im Kern gebundenen rRNA und ihren Vorstufen war der Methyleinbau vermindert. Jedoch ist zweifelhaft, ob hier eine Untermethylierung vorlag, denn aus dem Orotsäureexperiment ergab sich eine verringerte Synthese von kern-

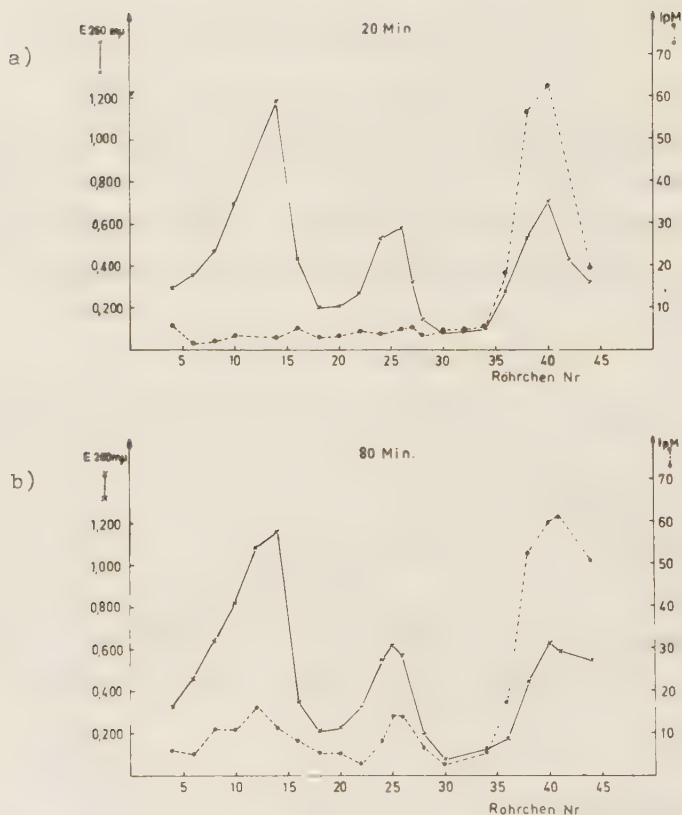


Abb. 10 Zonengradienten-Zentrifugation der 4° -Fraktion aus präcanceröser Leber (30 Tage DENA-Fütterung) nach Injektion von (Methyl- ^3H)-L-Methionin.

Die Tiere erhielten intravenös 200 μCi Methionin pro 100 g Körpergewicht und wurden zu den angegebenen Zeiten getötet.

- a) 20 min nach Injektion (40 OD₂₆₀-Einheiten)
 b) 80 min nach Injektion (37 OD₂₆₀-Einheiten)

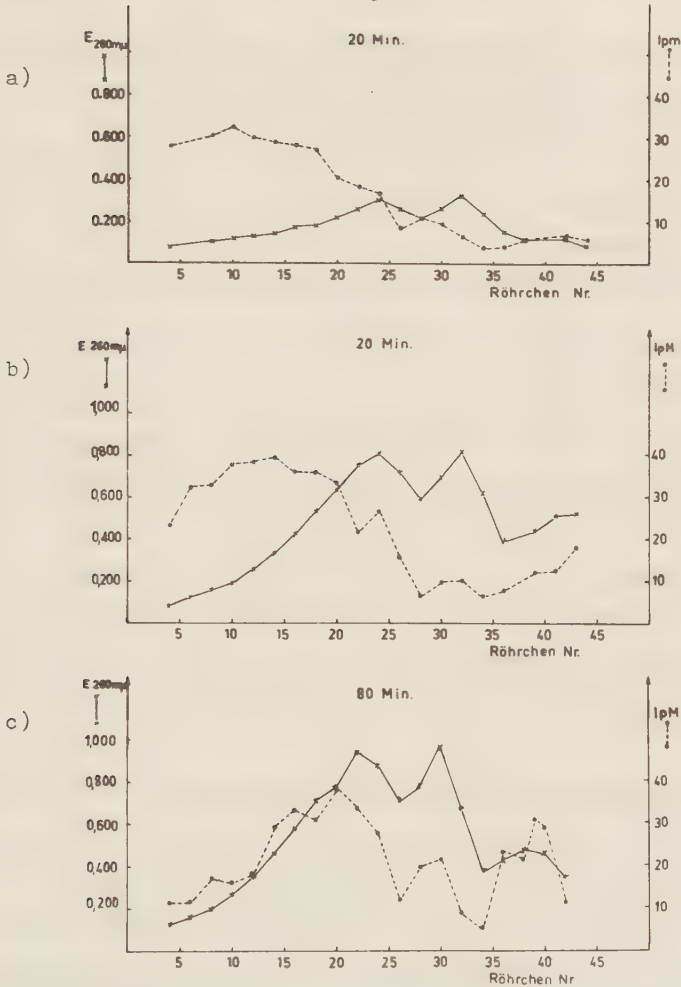


Abb. 11 Zonengradienten-Zentrifugation der 50⁰-Fraktion aus normaler und präcanceröser Leber (30 Tage DENA-Fütterung) nach Injektion von (Methyl-³H)-L-Methionin. Die Tiere erhielten intravenös 200 μ Ci Methionin pro 100 g Körpergewicht und wurden zu den angegebenen Zeiten getötet.

- a) normale Leber, 20 min nach Injektion
(Diagramm entspr. Abb. 7a)
- b) präcanceröse Leber, 20 min nach Injektion
(35,5 OD₂₆₀-Einheiten)
- c) präcanceröse Leber, 80 min nach Injektion
(40,5 OD₂₆₀-Einheiten)

gebundener RNA. Es scheint, daß der geringere Methyleinbau eine Folge dieser verringerten RNA-Synthese war.

In manifesten Tumoren wurde von anderen Autoren eine deutliche Übermethylierung (50 - 300 %) von tRNA gefunden (40, 41). Bei den hier benutzten Methoden konnten feine Veränderungen nicht erfaßt werden. Man kann jedoch feststellen, daß im frühen Stadium der Carcinogenese eine deutliche Übermethylierung bei keiner RNA gefunden wird.

CRADDOCK (56) führte ähnliche Untersuchungen mit dem homologen Carcinogen Dimethylnitrosamin durch. Bei etwas höherer Dosierung (ca. 5 mg/kg/Tag) fand die Autorin nach 50 Tagen eine geringe Erhöhung (10 %) der tRNA-Methylierung, aber keinen Einfluß auf die rRNA. Nach Ausbruch des Tumors bauten tRNA und rRNA stärker Methylgruppen ein, jedoch wurde die verstärkte rRNA-Methylierung auf höhere rRNA-Synthese zurückgeführt.

3.2. Untersuchung der tRNA-Methylasen in vitro

Neben der RNA-Methylierung in vitro wurden die tRNA-Methylasen von DENA-behandelten Ratten in vitro untersucht. Der Methylasentest bestand darin, daß hochtourig zentrifugierter Überstand vom jeweiligen Leberhomogenat mit tRNA von E. coli und radioaktiv markiertem S-Adenosylmethionin inkubiert wurde. Die dabei in die RNA eingebaute Radioaktivität wurde dann gemessen.

3.2.1. Einfluß der DENA-Behandlung auf die Methylasenaktivität

Tab. 3 zeigt den Einfluß unterschiedlicher Behandlungsdauer auf die Aktivität der Methylasen. In der Tabelle ist ein Ver-

Tab. 3 Aktivität der tRNA-Methylasen in der Leber von DENA-behandelten Ratten und normalen Ratten.
Im Standardtest wurde Homogenatüberstand mit 0,5 - 1 mg Protein eingesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte und die mittleren Fehler der Mittelwerte. In Klammern die Zahl der Tiere.

	DENA-Ratten (IpM/mg Protein/Std.)	Kontrollen (IpM/mg Protein/Std.)
30 Tage DENA	17.900 $\pm$ 770 (3)	17.900 $\pm$ 1.100 (2)
175 Tage DENA	11.000 $\pm$ 250 (2)	6.500 $\pm$ 280 (4)
180 Tage DENA	15.000 $\pm$ 800 (6)	9.600 $\pm$ 320 (5)
30 Tage DENA + 150 Tage Normal- diät	6.220 $\pm$ 330 (5)	6.000 $\pm$ 300 (4)

gleich nur zwischen einer DENA-Gruppe und der zugehörigen Kontrollgruppe möglich, nicht aber zwischen verschiedenen Gruppen, da ^3H -SAM-Chargen unterschiedlicher spezifischer Radioaktivität benutzt wurden. Die Tabelle zeigt, daß nach 30tägiger DENA-Behandlung die Methylasenaktivität unverändert ist. Nach 175 - 180 Tagen DENA-Gabe, wenn die Leber von Tumorknoten durchsetzt ist, findet man einen Aktivitätsanstieg um etwa 60 %. Da die Aktivität aus dem Homogenat der ganzen Leber ermittelt wurde, ist im Tumorgewebe selbst der Anstieg möglicherweise noch höher. Behandelt man 30 Tage lang mit DENA und gibt anschließend noch 150 Tage lang Normaldiät, findet man eine Methylasenaktivität wie bei den Kontrolltieren. Die Lebern sehen normal aus. Demnach kann die höhere Methylasenaktivität in tumorösem Gewebe nicht auf frühe Schädigungen in der Carcinogenese zurückgeführt werden.

3.2.2. Spezifität der Methylasen

3.2.2.1. Zur Methode der Basenanalyse

Um den Anteil einzelner Methylbasen an der in vitro eingebauten Gesamtradioaktivität zu bestimmen, wurde die RNA aus dem Inkubationsansatz isoliert, in Perchlorsäure hydrolysiert und die freigesetzten Basen dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

Die Vollständigkeit der Hydrolyse wurde überprüft und gefunden, daß bei Elektrophorese des Hydrolysats die gesamte Radioaktivität mit den Basen wandert und nicht mit den zur Markierung zugesetzten Nucleosiden oder Nucleotiden.

Von 1mA (57) und 5mC (15) wurde berichtet, daß sie unter sauren Hydrolysebedingungen instabil sein können. Gemessen am UV-Spektrum wurde bei der hier benutzten Methode kein 1mA und höchstens 10 % 5mC zersetzt.

Zur Auftrennung der Basen des RNA-Hydrolysats wurden 2 Fließmittelsysteme benutzt. In beiden Fällen wurde in der ersten Dimension mit Methanol-Salzsäure entwickelt. Für die zweite Dimension wurde Butanol-Essigsäure oder ein Ammoniumsulfathaltiges Fließmittel benutzt. Die Auftrennung der Basen gelang besser mit dem letzteren (Abb. 12), das darum zuerst vorwiegend benutzt wurde. Die erhaltenen Werte waren bei Benutzung eines Systems reproduzierbar, obgleich nur ein Teil der aufgetragenen Radioaktivität wiedergewonnen wurde. Jedoch ergaben die beiden Systeme unterschiedliche Basenverhältnisse für dasselbe Hydrolysat (Tab. 4). Zur Kontrolle wurden darum Anteile eines Hydrolysats einer in vitro methylierten RNA auf

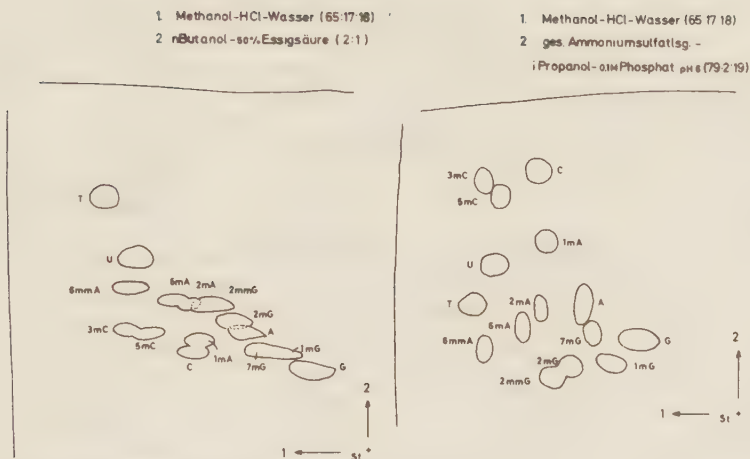


Abb. 12 Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Methylbasen. Von jeder Methylbase wurden etwa 0,05 OD₂₅₄-Einheiten aufgetragen.

einer Dowex-Ionenaustauschersäule bzw. dünnschichtchromatographisch nach den beiden Methoden aufgetrennt. Von der Austauschersäule wurden über 95 % der aufgetragenen Radioaktivität wiedergewonnen. Auch wurde Radioaktivität nur dort eluiert, wo die entsprechenden Methylbasen zu erwarten waren. Das Hydrolysat enthielt also keine Radioaktivität außer der in den bekannten Methylbasen. Tab. 4 zeigt den Vergleich der Trennsysteme. Die Werte des "Butanol-Essigsäure-Systems" stimmen besser mit den Werten der Dowex-Chromatographie überein. Dieses Butanol-Essigsäure-System wurde daraufhin für quantitative Basenanalysen benutzt. Es ist möglich, daß beim anderen System das an der Zellulose anhaftende Ammoniumsulfat die Extraktion der Basen mit Methoxyäthanol unterschiedlich beeinflusst.

Tab. 4 Basenanalyse einer in vitro methylierten tRNA mit verschiedenen Trennsystemen. Angegeben sind die Anteile der einzelnen Methylbasen an der wiedergefundenen Radioaktivität.

Methyl- base	Dünnschichtchromatographie		Dowex-Säulen- chromatographie
	Fließmittel der 2. Dimension: Ammonium- sulfatlösung	Butanol- Essigsäure	
1mA	10 %	20 %	22 %
5mC	40 %	39 %	36 %
2mG	19 %	16 %	16 %
2mmG	31 %	25 %	26,5 %

3.2.2.2. Aktivität einzelner Methylasen in präcanceröser Leber

Die Methylasenaktivität in der präcancerösen Leber war unverändert gegenüber der von Kontrolltieren (Tab. 3). Um individuelle Aktivitätsschwankungen einzelner Methylasen zu erfassen, wurde die in vitro methylierte RNA hydrolysiert und die relative Menge der gebildeten Methylbasen ermittelt. Dieses Methylbasenverhältnis wurde als Maß für das Verhältnis der einzelnen Methylasenaktivitäten genommen. Tab. 5a zeigt das Verhältnis der Methylbasen, wie es nach Chromatographie im Ammoniumsulfathaltigen Fließmittel erhalten wurde. Zusätzlich wurde in allen Fällen 1-Methylguanin gefunden, wegen der geringen Zählwerte (2 - 5 % der gesamten Radioaktivität) jedoch beim quantitativen Vergleich nicht berücksichtigt. Aus der Tabelle geht hervor, daß sich nach 30 Tagen DENA-Behandlung auch der relative Anteil der einzelnen Methylasen an der Gesamtaktivität

nicht geändert hat.

Tab. 5 Basenanalyse von tRNA nach Methylierung mit Homogenat-
überstand von normaler, präcanceröser und tumoröser
Leber. Die Proteinkonzentrationen im Test entsprachen
denen von Tab. 3. Angegeben sind die Anteile der ein-
zelnen Methylbasen an der wiedergefundenen Radioak-
tivität.

- a) Präcanceröse und normale Leber. In der 2. Dimension wurde
mit Ammoniumsulfatlösung chromatographiert.

	DENA-Ratten (30 Tage Behandlung)	Kontrolle
1mA	10 %	10 %
5mC	39 %	41 %
2mG	21 %	20 %
2mmG	30 %	29 %

- b) Tumoröse und normale Leber. In der 2. Dimension wurde
mit Butanol-Essigsäure chromatographiert.

	DENA-Ratten (180 Tage Behandlung)	Kontrolle
1mA	17 %	17 %
5mC	41 %	41 %
2mG	17 %	15 %
2mmG	25 %	26 %

3.2.2.3. Aktivität einzelner Methylasen in tumoröser Leber

Die Lebern mit DENA-Tumoren enthielten pro mg Protein 60 % mehr Methylasenaktivität als die Kontrollen. Mit Basenanalyse wurde auch hier nach einer Verschiebung des Anteils der einzelnen Methylasen an der Gesamtaktivität gesucht. Das RNA-Hydrolysat wurde aufgetrennt mit Butanol-Essigsäure als Fließmittel der 2. Dimension. Tab. 5b zeigt, daß die relative Aktivität der Methylasen auch im DENA-Tumor unverändert blieb. Die Aktivität aller Methylasen war also im gleichen Maße gestiegen. Neue Methylasen traten nicht auf.

Tab. 6 Versuch zur Methylierung homologer tRNA mit Methylasen aus tumoröser (180 Tage DENA-Behandlung) und aus normaler Leber. Im Standardtest wurde Homogenat-überstand mit 98 µg Protein aus tumoröser bzw. 140 µg Protein aus normaler Leber eingesetzt.

RNA	Homogenatüberstand			
	aus DENA-Tumor		aus normaler Leber	
keine (Blindwerte)	131	IpM	109	IpM
50 µg E.coli-tRNA	1 530	"	1 370	"
50 µg Ratten-tRNA	139	"	115	"
350 µg Ratten-tRNA	118	"	98	"

3.2.2.4. Aktivität der Methylasen gegenüber homologer tRNA

Einige Autoren (58 - 60) fanden, daß Tumormethylasen die tRNA derselben Species in vitro methylierten, ein Effekt, der mit Methylasen aus gesundem Gewebe nicht gelingt. Entsprechend diesen Versuchen wurde Rattenleber-tRNA mit dem Überstand von tumorösen DENA-Lebern inkubiert. Um geringe Methylierungen zu

erfassen, wurden auch hohe Mengen Ratten-tRNA in den Ansatz gegeben. Nach Tab. 6 erfolgt aber weder durch normales, noch durch Tumorprotein ein Einbau von Methylgruppen in homologe tRNA.

3.2.3. Diskussion

CRADDOCK (61) untersuchte ebenfalls Methylasen in Nitrosamin-induzierten Tumoren. Im Gegensatz zu den hier berichteten Ergebnissen folgte die Autorin, daß die einzelnen Methylasen unterschiedlich verändert sind. Sie inkubierte jedoch nicht mit RNA-Überschuß, bestimmte also nicht die Enzymaktivitäten, sondern untersuchte die Methylbasen von in vitro erschöpfend methylierter RNA. Die Aktivitätsbestimmung scheint jedoch die zuverlässigere Methode zur Charakterisierung zu sein, da andere Faktoren als die Methylasen selbst das Methylierungsmaß in vitro beeinflussen (siehe Abschnitt 5.6.). SHEID et al. (62) fanden bei verschiedenen Morris-Hepatomen der Ratte (so genannten minimal deviation tumors) eine erhöhte Gesamtaktivität der Methylasen, aber auch keinen Unterschied in der relativen Aktivität der einzelnen Enzyme. Dagegen fanden TURKINGTON et al. (39) beim Brustdrüsencarcinom der Maus, daß die einzelnen Methylasen unterschiedlich stark erhöht waren und daß eine neue Methylase auftrat, die beim gesunden Tier in meßbaren Mengen nur in anderen Geweben vorkam. Das Auftreten neuer Methylasen wurde auch bei Hühnerlebern mit virusinduzierten Tumoren beschrieben (63).

WAALKES et al. (64) untersuchten DENA-Tumoren in Affenlebern. Sie fanden, daß Tumorprotein die tRNA von gesunden Affen in

geringem Ausmaß methylieren konnte. In gleichem Umfang wurde aber auch die tRNA des Tumors selbst methyliert. Diese RNA mußte in bezug auf die Tumormethylasen schon voll methyliert sein, bevor sie isoliert wurde. Die Autoren schreiben darum den Effekt den Testbedingungen zu.

Die Testbedingungen sind ein kritischer Punkt bei der Untersuchung der Methylasen *in vitro*. Nach KAYE et al. (65) beeinflusst das Ionenmilieu nicht nur die Aktivität und scheinbare Zusammensetzung einer Methylasenpräparation, sondern auch die meßbaren Aktivitätsunterschiede zwischen zwei Präparationen.

In normaler Rattenleber sind Methylaseninhibitoren gefunden worden, die im Tumorgewebe nicht vorhanden sind (66, 67). Andererseits stimulieren Polyamine die RNA-Methylasen und es ist auf die Möglichkeit hingewiesen worden, daß Polyamine die Methylasen regulieren (68). Unterschiedlicher Gehalt der Gewebe an Polyaminen und Inhibitoren kann *in vitro*, besonders bei undialysierten Gewebsextrakten, unterschiedliche Methylasenaktivität vortäuschen. Beobachtete Veränderungen der Gesamtaktivität, der relativen Aktivität einzelner Methylasen und des Methylierungsausmaßes, das bei gegebener RNA-Menge erzielbar ist, sind zum Teil auf diese Effekte zurückzuführen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die Methylasentests in 0,3 N Kaliumacetat durchgeführt. 0,3 - 0,4 M einwertiger Kationen hemmen die Inhibitoren (66), stimulieren aber die Methylasen (65) und können die Polyamine ersetzen (68, 69). Es wurde angenommen, daß im Gewebsextrakt vorhandene Polyamine nach 2 Stunden Dialyse so weit entfernt sind, daß sie den Test

nicht mehr beeinflussen.

Mit diesem Methylasentest wurde nur bei manifestem Tumor eine Erhöhung der Aktivität beobachtet. Qualitative Veränderungen, wie ein verschobenes Methylasenspektrum, das Auftreten neuer Methylasen oder die Fähigkeit, homologe tRNA zu methylieren, wurden nicht gefunden. Die quantitative Veränderung geht nicht auf die frühe Zeit der Carcinogenese zurück. Aus diesen Befunden ergibt sich also kein Hinweis darauf, daß Methylasen an der Entstehung der DENA-Tumoren beteiligt sind.

Die Bedeutung der Methylasen für die Tumorentstehung wurde schon durch Experimente von BAGULEY und STAEHELIN (23) in Frage gestellt. Diese Autoren fanden, daß erhöhte Methylasenaktivität nicht zu einer Über- oder Fehlmethylierung von tRNA in vivo führen muß, selbst dann nicht, wenn mit diesen Methylasen in vitro ein höheres Methylierungsausmaß erreicht wird. Bei 40facher Reinigung von Adenin-1-Methylase aus normaler und leukämischer Milz blieb der 6fache Aktivitätsunterschied erhalten, so daß ein höherer Methylasengehalt des leukämischen Gewebes gesichert ist. Das unterschiedliche Methylierungsausmaß, das die beiden Rohenzyme in vitro bewirkten, glich sich dagegen mit der Reinigung aus. Die gereinigte Adeninmethylase übertrug mehr Methylgruppen pro tRNA-Molekül, als alle Methylasen im normalen Rohextrakt zusammen übertragen konnten. Die Rohextrakte müssen demnach, in unterschiedlicher Menge, Faktoren enthalten, die das Methylierungsausmaß in vitro einschränken.

Sequenzanalyse der in vitro methylierten tRNA zeigte, daß Tumormethylase und Vergleichsenzyme die gleichen Nucleotidse-

quenzen methylieren, die Sequenzen nämlich, in denen 1-Methyladenin auch bei Ratten-tRNA vorkommt. Außerdem fanden dieselben Autoren (23), und mit einer neuen Analysenmethode auch RANDERATH (8), in Tumoren keine erhöhte Methylierung der tRNA. Der gefundene Methylgehalt lag bei tumorösem und gesundem Gewebe noch über dem, was früher bei Tumoren als Übermethylierung bezeichnet wurde. Eine Erklärung für die Diskrepanz steht noch aus. Die neuen, hohen Werte sind aber in besserer Übereinstimmung mit den bisher ermittelten über 20 tRNA-Sequenzen (70).

4. LOKALISATION DER tRNA-METHYLASEN

Nach bisherigen Untersuchungen anderer Autoren sind die gut löslichen tRNA-Methylasen vorwiegend im Cytoplasma und nur zu einem kleinen Prozentsatz im Zellkern zu finden (36, 51, 71). Dieses Ergebnis wurde mit wäßrigen Methoden der Zellfraktionierung gewonnen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gefunden, daß die Methylierung der tRNA entweder im Cytoplasma oder im löslichen Raum des Zellkerns erfolgt. Eine Differenzierung zwischen diesen Räumen war von der Methodik her nicht möglich. Zur Klärung dieser Frage müßten Zellkern und Cytoplasma vor der RNA-Extraktion getrennt werden. Damit während der Trennung dieser Zellbestandteile keine Diffusion von RNA aus der einen in die andere Fraktion stattfindet, müßte ein Trennverfahren angewendet werden, das technisch und, wegen des Bedarfs an radioaktiven Substanzen, auch finanziell sehr aufwendig ist. Diese Methode der diffusionsfreien Kernisolierung, die auf Zerkleinern und Fraktionieren eines gefriergetrockneten Gewebes in organischen Lösungsmitteln beruht, kann jedoch ohne größere Schwierigkeiten für die zweifelsfreie Lokalisation löslicher Enzyme benutzt werden. Darum wurde der zelluläre Ort der tRNA-Methylasen neu bestimmt in der Hoffnung, so zu einer Klärung des Ortes der tRNA-Methylierung zu kommen.

4.1. Methylasen in wäßrigen Kernpräparationen

Zunächst wurden Zellkerne aus wäßrigen Homogenaten nach drei verschiedenen Methoden gewonnen. Die Methoden unterschieden sich vor allem im Saccharosegehalt der Lösungen, in denen

homogenisiert bzw. zentrifugiert wurde. Methylasenaktivität und Proteingehalt wurden in den hochtourigen Überständen eines Gesamthomogenates ("Cytoplasma", denn bei der Herstellung des Gesamthomogenates werden die Kerne nicht zerstört) und der Kernhomogenate ("Kerne") bestimmt. DNA-Gehalt wurde in den Homogenaten gemessen.

Tab. 7 tRNA-Methylasenaktivität in Cytoplasma und Zellkernen, die nach verschiedenen wäßrigen Verfahren präpariert wurden. Eine Methylaseneinheit ist die Enzymmenge, die im Standardtest 1 nMol Methylgruppen überträgt.

Fraktion	Methylasen-Einheiten	
	pro mg lösliches Protein	pro mg DNA
Cytoplasma (36)	0,17 - 0,20	1,9
Zellkerne nach (36)	0,02 - 0,03	0,03 - 0,08
" " (72)	0,07	0,06
" " (50)	0,14 - 0,22	0,10 - 0,16

Tab. 7 zeigt, daß die Kernfraktionen pro mg löslichen Proteins die gleiche oder weniger Methylasenaktivität enthalten als die Cytoplasmafraktion. Die geringste Aktivität findet man in der 3fach gewaschenen Kernpräparation nach SIMON et al. (36). Pro mg DNA ist die Enzymaktivität in allen Kernextrakten sehr viel geringer als im Überstand des Gesamtzellhomogenates, d.h. im Cytoplasma. Nach diesen Werten scheinen die Methylasen vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert zu sein. Immerhin ist es auffällig, daß die höchsten nucleären Methylasenwerte in der Präparation nach MURAMATSU und FUJISAWA (50) gefunden werden, bei der

durch ausschließliche Benutzung von 2,2 M Saccharose eine Diffusion erschwert ist.

4.2. Methylasen in nichtwäßrigen Kernpräparationen

Nach dem nichtwäßrigen Verfahren von SIEBERT (73) wurden Cytoplasma und Zellkerne unterschiedlicher Reinheit präpariert. Die Fraktionen wurden zusammen mit unfractioniertem, gefriergetrocknetem Lebergewebe untersucht. DNA wurde im Trockenmaterial bestimmt, Protein und Methylasenaktivität in den hochtourigen Überständen von wäßrigen Suspensionen der verschiedenen Trockenpulver.

4.2.1. Aktivität in verschiedenen Zellfraktionen

Tab. 8 enthält den DNA-Gehalt des unfractionierten Gewebes und der Zellfraktionen und die jeweilige Methylasenaktivität in Relation zu löslichem Protein bzw. zu DNA.

Tab. 8 tRNA-Methylasenaktivität im Gewebspulver und in nichtwäßrig präparierten Zellfraktionen.

Fraktion	Methylasen-Einheiten		
	DNA (%)	pro mg lösliches Protein	pro mg DNA
lyophilisiertes Lebergewebe	1,0	0,09 - 0,12	4,0 - 4,7
desgl., beh.mit org. Lsgs.-mitteln	0,8	0,08	3,5 - 3,9
Cytoplasma	0,4	0,03 - 0,04	2,0 - 2,9
partiell gereinigte Zellkerne	10,5	0,7	2,6
reine Zellkerne	14,5	1,2	2,6

Die ersten beiden Zeilen zeigen, daß die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln einen leichten Abfall der Enzymaktivität bewirkt. Im Gegensatz zu wäßrigen Methoden führt die nicht-wäßrige Gewebsfraktionierung jedoch zu Kernen mit hoher Methy-lasenaktivität. Bezogen auf das lösliche Protein ist die spezifische Aktivität im Zellkern 30fach höher als in der entsprechenden Cytoplasmafraktion.

Daß die Methylasen vorwiegend im Zellkern lokalisiert sind, geht am deutlichsten aus den DNA-bezogenen Werten hervor: Das Enzym/DNA-Verhältnis bleibt während der Reinigung der Kerne annähernd konstant. Das bedeutet, daß Cytoplasma- und Zellkernfraktionen unterschiedlicher Reinheit nur soviel Methylasenaktivität enthalten, wie es ihrem Gehalt an DNA und damit dem Gehalt an Zellkernen entspricht. Dies ist ein Kriterium für Kernenzyme (74). Bei jedem cytoplasmatischen Enzym dagegen sinkt der Enzym/DNA-Quotient in der Kernfraktion im Laufe der Reinigung und steigt im restlichen zellulären Material, je mehr Kerne (d.h. DNA) entfernt werden.

4.2.2. Eigenschaften der Methylasen aus Zellkernen und Cytoplasma

Wenn die Methylasen in der nichtwäßrigen Cytoplasmapräparation zumindest größtenteils aus einer Verunreinigung an restlichen Zellkernen stammen, dann sollten die Methylasen aus dieser Fraktion und die aus Zellkernen die gleichen Eigenschaften besitzen. Das wurde untersucht.

4.2.2.1. Substratspezifität und Optima von pH, Temperatur und Ionenstärke

Die Methylasen aus beiden Quellen sind aktiv gegen tRNA aus E. coli B und völlig inaktiv gegen gereinigte ribosomale RNA von E. coli B. Nach Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten zwischen pH 7,0 und 9,2 von 0 bis 0,6 M Kaliumacetat und zwischen 30 und 48° C ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Optimalwerten (Tab. 9). Wegen der unvermeidlichen großen Unterschiede der Enzym- bzw. Proteinkonzentration zwischen den verglichenen Testansätzen müssen diese Daten jedoch vorsichtig interpretiert werden.

Tab. 9 Vergleich der tRNA-Methylasen aus nichtwässrigen Kern- und Cytoplasmapräparationen. Außer dem jeweils variierten Parameter entsprachen alle Inkubationsbedingungen dem Standardtest. Es wurden 70 - 90 µg lösliches Kernprotein bzw. 400 - 500 µg lösliches Cytoplasmaprotein eingesetzt.

	Aktivitätsmaxima		
	pH	Ionenstärke (Kaliumacetat)	Temperatur
Cytoplasmafraktion	8,2 - 8,5	0,30 M	40 - 42° C
Kernfraktion	8,2 - 8,6	0,35 - 0,40 M	42 - 44° C

4.2.2.2. Basenspezifität

Extrakte aus nichtwäßrigen Kernen, Cytoplasma und gefriergetrocknetem Leberpulver wurden im Standardtest eingesetzt und die gebildeten Methylbasen analysiert. In allen Fällen wurden die gleichen Methylbasen gefunden, nämlich 1mA (10 - 20 %), 5mC (40 - 55 %), 2mG (10 - 25 %), 2mmG (15 - 25 %) und kleine Mengen 1mG. Die Basen wurden bei drei verschiedenen Fließmittelkombinationen nachgewiesen. Bei Rechromatographie eines Fleckens in einem anderen Fließmittel wanderte die Radioaktivität mit der Vergleichsbasis.

Die gleichen Basen werden auch bei Inkubation mit den Überstandsproteinen wäßriger Leberhomogenate gebildet. Nicht gefunden wurden dagegen 7mG und 5mU (T), die von RODEH et al. (24) als Reaktionsprodukte von Lebermethyhasen angegeben wurden. Der Unterschied könnte daran liegen, daß RODEH et al. methyalarne RNA anstatt normaler als Substrat benutzten.

4.2.2.3. Sequenzspezifität

Weiterhin wurde die Möglichkeit untersucht, daß Kern- und Cytoplasma-Enzyme zwar die gleichen Methylbasen bilden, aber andere Kurzsequenzen erkennen, sich also in der Sequenzspezifität unterscheiden. Wenn das der Fall ist, müßte man mit Cytoplasmaextrakt noch Methylgruppen in eine RNA einbauen können, die schon durch Kernenzyme erschöpfend methyliert wurde.

In zwei parallelen Ansätzen mit markiertem und unmarkiertem S-Adenosylmethionin wurde RNA so lange mit Kernextrakt inkubiert, bis keine weitere Radioaktivität mehr in die RNA eingebaut wurde. Zu dem radioaktiven Ansatz wurde dann Cytoplasma-

extrakt gegeben und weiter inkubiert. Es erfolgte keine Zunahme der RNA-Markierung.

Die methylierte RNA des nichtradioaktiven Ansatzes wurde durch Phenolextraktion isoliert und je eine Hälfte davon mit Kernextrakt bzw. Cytoplasmaextrakt und radioaktivem SAM erneut inkubiert. Beide Extrakte bauten noch etwa 2 % Methylgruppen zusätzlich ein. Aus den beiden beschriebenen Versuchen wird geschlossen, daß sich die Methylasenaktivität aus nichtwäßrigen Kernen und Cytoplasma gegen die gleichen RNA-Sequenzen richtet.

4.2.2.4. Gelchromatographie

Bei Versuchen zur Anreicherung der Methylasen wurde Kernextrakt gelchromatographiert. Mit einer 1 x 90 cm Sephadex-G-200-Säule wurden die Methylasen in 2 größere Aktivitätsgipfel gespalten. Die zuerst eluierende Aktivität enthielt vorwiegend Adenin-1-methylase, die folgende vor allem Guanin-2-methylase. Die gleiche Verteilung ist von BAGULEY und STAEHELIN (23) für tRNA-Methylasen aus dem hochtourigen Überstand wäßriger Rattenleberhomogenate angegeben worden. Dieses und die vorhergehenden Experimente weisen auf eine Identität der tRNA-Methylasen aus wäßrigen Cytoplasmapräparationen mit den RNA-Methylasen aus den nichtwäßrigen Fraktionen.

4.3. Diskussion

In den frühesten Arbeiten zur Lokalisation der RNA-Methylierung berichteten BIRNSTIEL et al. (75) und SIRLIN et al. (76) von tRNA-Methylierung im Nucleolus von Erbsenkeimlingen bzw. Insektenlarven. BIRNSTIEL et al. fanden im Nucleolus auch eine tRNA-methylierende Aktivität (75). Diese Beobachtungen bezie-

hen sich aber wahrscheinlich auf ribosomale RNA. Zu der Zeit war noch nicht bewiesen, daß diese RNA im Nucleolus synthetisiert wird. Daß rRNA auch methyliert wird, war völlig unbekannt.

Später fanden BAGULEY und STAEHELIN (71) sowie SIMON et al. (36) tRNA-Methylasen im Überstand wäßriger Gewebshomogenate, während die Kernfraktion nur geringe Mengen dieser Enzyme enthielt. Dieselbe Verteilung wurde in der vorliegenden Arbeit bei Fraktionierung wäßriger Homogenate gefunden. Diese Methoden haben jedoch den Nachteil, daß lösliche Komponenten aus dem Zellkern herausgewaschen werden können. Enzymlokalisationen, die auf wäßrigen Zellfraktionierungen beruhten, gelten nur mit dieser Einschränkung (77, 78).

Nichtwäßrige Methoden schließen den Verlust löslicher Substanzen aus dem Zellkern aus. Darum sind sie viel besser geeignet, den Ort eines Enzyms innerhalb der Zelle zu bestimmen (78). Das gilt, obwohl bei nichtwäßriger Kernisolierung zelluläre Strukturen, besonders Membranen, angegriffen werden und Cytoplasmareste nicht so gut entfernt werden können wie bei anderen Methoden (77).

Durch die nichtwäßrige Zellfraktionierung wurden Zellkerne gewonnen, die RNA-Methylasen in 30fach höherer spezifischer Aktivität enthielten als die Cytoplasmafraktion. Während der Kernreinigung bleibt der Enzym/DNA-Quotient konstant, so daß die Methylasen nicht aus Cytoplasmaresten in der Kernfraktion stammen können. Also ist zumindest der größte Teil der gefundenen Methylasenaktivität im Zellkern lokalisiert. Diese Kernenzyme sind identisch mit denen aus der nichtwäßrigen Cyto-

plasmapräparation. Beide Gruppen sind nur mit Transfer-RNA aktiv. Die mit diesen Methylasen in vitro gebildeten Methylbasen kommen in der Ratten-tRNA vor (56) und werden auch von den aus wäßrigem Leberhomogenat bekannten tRNA-Methylasen gebildet (24). Also sind die gefundenen methylierenden Enzyme tRNA-Methylasen. Es wird gefolgert, daß die tRNA-Methylasen, als deren Lage bisher das Cytoplasma angenommen wurde, vorwiegend im Zellkern vorkommen.

Kinetische Experimente von MURAMATSU und FUJISAWA (50) und von BURDON et al. (51) haben zu dem Schluß geführt, daß die tRNA von Säugetieren im Cytoplasma methyliert wird. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist nicht auszuschließen, daß die Methylasen außen an der Kernmembran haften, obwohl dies wegen der guten Löslichkeit der Enzyme unwahrscheinlich ist. Es könnte aber auch sein, daß bei den kinetischen Experimenten frisch methylierte tRNA aus dem Zellkern ebenso herausgewaschen wurde, wie es mit den Methylasen passiert ist. Andererseits schließen die Ergebnisse ein Vorkommen von Methylasen und Methylierung im Cytoplasma nicht aus. Die Anhäufung von Methylasen im Zellkern wäre jedoch kaum verständlich, wenn nicht dort auch die tRNA-Methylierung erfolgt.

5. WEITERE EIGENSCHAFTEN DER tRNA-METHYLASEN

Einige Eigenschaften der tRNA-Methylasen wurden schon im Abschnitt über die Lokalisation dieser Enzyme beschrieben. Weitere Eigenschaften wurden vor allem in Hinblick auf eine geplante Reinigung der Enzyme untersucht. Die im Folgenden aufgeführten Daten wurden meistens sowohl mit einem Extrakt aus nichtwäßrigen Leberzellkernen (kurz: Kernextrakt) wie auch mit dem hochtourigen Überstand wäßriger Leberhomogenate (kurz: Homogenatüberstand) aufgenommen. Zwischen beiden Präparationsformen wurden keine grundsätzlichen Unterschiede gefunden.

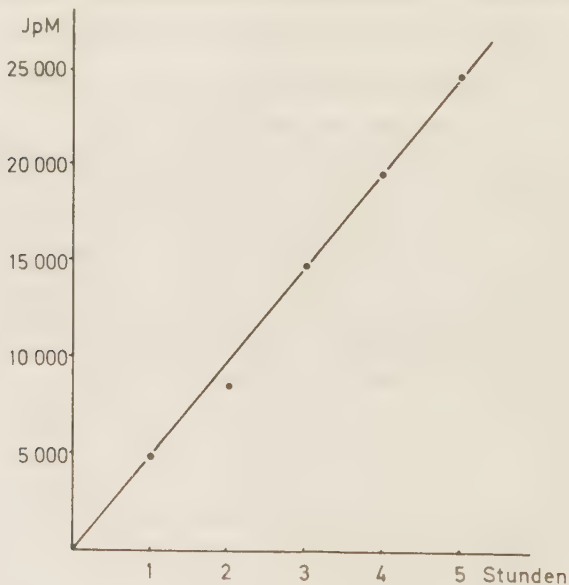


Abb. 13 Methyleinbau mit der Zeit bei Überschuß an tRNA. In einem 8fachen Standardtest (2,4 ml) wurden 960 µg Kernextraktprotein und 800 µg E.coli-tRNA inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 0,3 ml entnommen und eingebaute Radioaktivität bestimmt. Angegeben sind die Zählwerte nach Abzug der Blindwerte.

5.1. Einfluß der RNA-Konzentration auf den Methyleinbau

5.1.1. RNA-Überschuß

Abb. 13 zeigt den zeitlichen Verlauf des Methyleinbaus bei RNA-Überschuß. Der Einbau war über Stunden linear. Die Methy-
lasen sind also bei den gewählten Inkubationsbedingungen
sehr stabil.

5.1.2. Begrenzende RNA-Konzentration

War die RNA-Menge nicht ausreichend, um über den ganzen Zeit-
raum einen Substratüberschuß zu garantieren, so fiel die Reak-
tionsgeschwindigkeit nach einer Weile auf einen niedrigeren,
aber ebenfalls für einige Zeit konstanten Wert, bevor ein
Plateau und damit Substraterschöpfung erreicht wurde (Abb. 14).

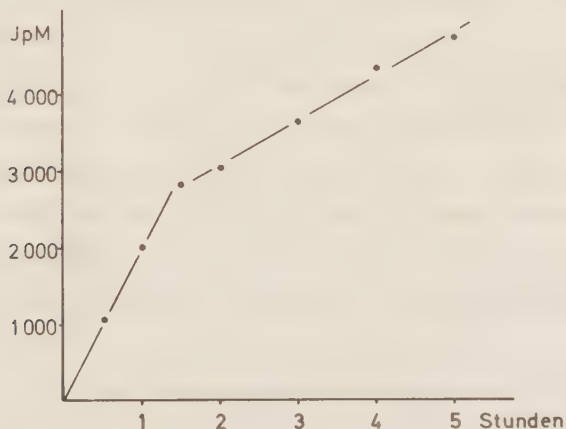


Abb. 14 Methyleinbau mit der Zeit bei begrenzter tRNA-Menge. Versuch wie bei Abb. 13, jedoch wurden 480 µg Kern-
protein und 40 µg tRNA eingesetzt.

Das gleiche Verhalten wurde von CULP und BROWN (79) bei tRNA-Methylasen aus Hela-Zellen beobachtet. Nach diesen Autoren sind am Knickpunkt "bestimmte Klassen" von Methylierungspunkten gesättigt. Das ist erklärlich, weil sich die methylierende Aktivität aus verschiedenen Methylasen zusammensetzt und das Substrat ein Gemisch verschiedener tRNA-Species ist.

Werden einem Inkubationsansatz mit 60 μ g Kernextraktprotein noch kleinere Mengen RNA zugesetzt, ist der in 2 Stunden gemessene Methyleinbau dieser RNA-Menge proportional (Abb. 15).

5.2. Die MICHAELIS-Konstanten für die beiden Substrate

5.2.1. Unfraktionierte tRNA

Bei zwei verschiedenen Methylasenkonzentrationen wurden im Standardtest steigende Mengen unfraktionierter tRNA von E.coli eingesetzt. Die ermittelten Werte wurden nach LINEWEAVER und BURK doppelt reziprok aufgetragen und so die scheinbare MICHAELIS-Konstante bestimmt (Abb. 16). Eine "scheinbare" Konstante deshalb, weil die Summe von Enzymaktivitäten gegen ein heterogenes Substrat bestimmt wurde. Der Wert sagt also nichts über die Affinität einzelner Enzyme zu spezifischen tRNAs, sondern zeigt nur, bei welcher Konzentration an unfraktionierter tRNA von E. coli die Gesamtaktivität der Methylasen 50 % des möglichen Maximums erreicht.

Auf diese Weise wurde ein Wert von 2 - 4 μ g bzw. 0,05 - 0,1 OD₂₆₀-Einheiten tRNA pro 0,3 ml bestimmt.

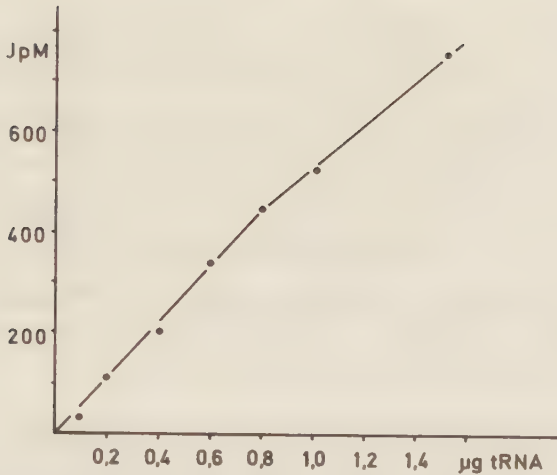


Abb. 15 Methyleinbau mit steigenden Mengen tRNA. Im Standardtest wurden die angegebenen tRNA-Mengen mit 80 µg Protein aus Kernextrakt 2 Stunden lang inkubiert.

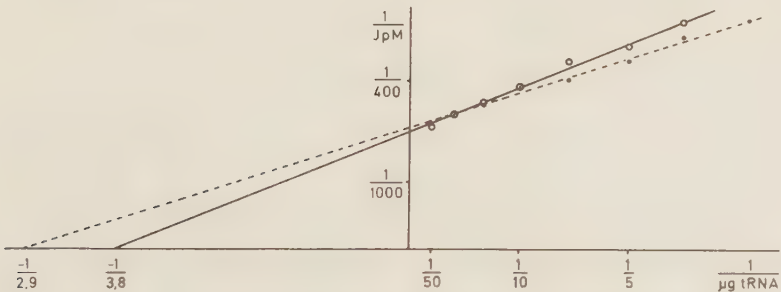


Abb. 16 Ermittlung der scheinbaren MICHAELIS-Konstante der unfractionierten Methylasen für tRNA. Im Standardtest wurden die angegebenen Mengen tRNA von *E. coli* (von höhermolekularer RNA gereinigt) und 26 µg (●---●) bzw. 150 µg (o—o) Protein aus Homogenatüberstand eingesetzt. Die Ansätze mit der höheren Proteinkonzentration wurden nur 10 min lang inkubiert, um den Konzentrationsabfall des untersuchten Substrats gering zu halten.

5.2.2. S-Adenosyl-Methionin

Eine scheinbare MICHAELIS-Konstante für SAM ließ sich nicht ermitteln. Die Werte für verschiedene SAM-Konzentrationen lagen in der LINEWEAVER-BURK-Aufzeichnung nicht immer auf einer Geraden, sondern, abhängig von der Enzymkonzentration, auf einer mehr oder weniger gekrümmten Kurve (Abb. 17). Derartige Kurven ergeben sich, wenn an der gemessenen Reaktion zwei oder mehr Enzyme mit sehr unterschiedlichen MICHAELIS-Konstanten für des Substrat beteiligt sind.

Die extrapolierten Kurven schneiden die Abszisse bei Werten, die fast so groß sind wie die SAM-Konzentration im Standardtest (17 μ M). Demnach liegt die SAM-Konzentration im Standardtest unter dem Sättigungswert für eine oder mehrere Methylasen.

5.3. Die Verdünnungsinaktivierung der Methylasen

5.3.1. Einfluß der Enzymkonzentration auf den Methyleinbau

Abb. 18 zeigt den Methyleinbau mit steigender Enzymmenge. Im Gegensatz zu den meisten bekannten Enzymen steigt die Aktivität nicht linear mit der Proteinmenge, sondern überproportional. Das heißt, daß die spezifische Aktivität (der Umsatz pro mg Protein) mit der Proteinkonzentration ansteigt. Umgekehrt betrachtet: einzelne oder alle tRNA-Methylasen verlieren in verdünnter Lösung an Aktivität. Da der Methyleinbau bei allen Enzymkonzentrationen proportional zur Zeit zunimmt, ein Abnehmen der Aktivität während der Inkubation also nicht beobachtet wird, muß der Prozeß der Verdünnungsinaktivierung rasch verlaufen (in den ersten Minuten der Inkubation oder vorher).

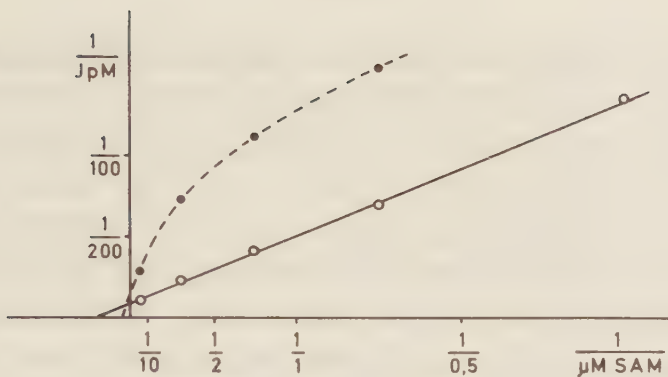


Abb. 17 Ermittlung der scheinbaren MICHAELIS-Konstante der unfractionierten Methylasen für SAM. Im Standardtest wurden die angegebenen Konzentrationen an ^3H -SAM und 24 μg (●-●-) bzw. 240 μg (o-o-) Protein aus Homogenat-überstand eingesetzt. Die Ansätze mit der höheren Proteinkonzentration wurden nur 10 min lang inkubiert, um den Konzentrationsabfall des untersuchten Substrats gering zu halten.

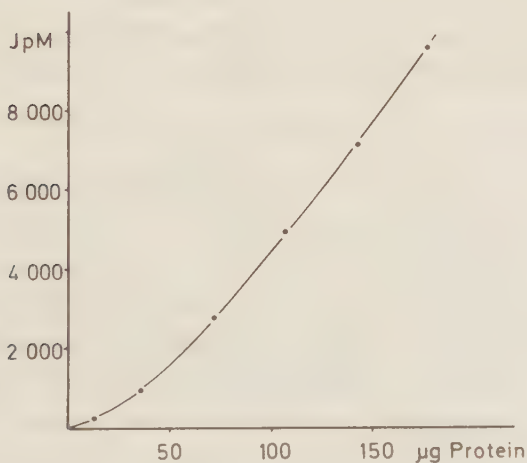


Abb. 18 Einfluß der Methylasenkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Im Standardtest wurden steigende Mengen Kernextrakt eingesetzt.

5.3.2. Mögliche Erklärungen der Verdünnungsinaktivierung

Bislang wurde von tRNA-Methylasen der Säugetiere ein linearer Anstieg berichtet (38, 71, 79). Es ist möglich, daß die Abweichung deshalb nicht gesehen wurde, weil die Autoren sehr hohe Proteinmengen einsetzten. Nur PEGG (80) berichtete, daß die gemessene Aktivität nicht proportional der eingesetzten Proteinmenge war. Der Autor gab aber nicht an, ob die spezifische Aktivität mit höherer Proteinkonzentration stieg oder fiel.

Für das überproportionale Ansteigen der Aktivität mit der Proteinmenge kann es mehrere Gründe geben (81):

- 1) Enzym besteht aus leicht dissoziierbaren Untereinheiten, die selber weniger oder gar nicht aktiv sind;
- 2) Enzym benötigt einen Aktivator oder Coenzym, welche in der Enzymlösung enthalten sind;
- 3) Reagenzien oder Inkubationsgefäße enthalten Verunreinigungen, durch die bei jedem Testansatz eine bestimmte Menge Enzym inaktiviert wird.

Im letzten Fall sollte die Kurve linear verlaufen, jedoch die Abszisse in einiger Entfernung vom Nullpunkt schneiden. Obwohl die Kurve tatsächlich gekrümmt und in Richtung Nullpunkt verläuft, ist eine Enzyminaktivierung durch Verunreinigungen nicht ausgeschlossen, weil es sich hier um ein Gemisch von Methylasen handelt. Wenn nur ein Teil der Methylasen empfindlich ist, muß auch bei sehr geringen Proteinkonzentrationen ein Rest an Aktivität zu beobachten sein.

5.3.3. Schutz gegen enzymtoxische Verunreinigungen

Die Inkubationsgefäße scheiden als Ursache für eine Enzyminaktivierung aus, denn eine Verkleinerung des Inkubationsansatzes

führte stets nur zu einer genau entsprechenden Verringerung der eingebauten Radioaktivität. Es wurde versucht, die Enzyme vor vermuteten toxischen Verunreinigungen in den Reagenzien zu schützen. Kaliumacetat, das ja in relativ hohen Konzentrationen eingesetzt wird, wurde vor Verwendung umkristallisiert. SAM wurde elektrophoretisch gereinigt wie von HURWITZ et al. für Methylasentests beschrieben (15). Weiter wurde der Zusatz verschiedener Mengen Serumalbumin, EDTA oder Glycerin, die Veränderung der Ionenstärke oder die Inkubation unter Stickstoff versucht. Keine dieser allgemeinen Maßnahmen zum Schutz von Enzymen hatte einen Einfluß auf die Kurvenform. Die Inaktivierung der Methylasen durch toxische Verunreinigungen ist daher nichtwahrscheinlich.

Die beschriebene Verdünnungsinaktivierung erschwerte eine Bestimmung der Enzymmenge. Wo möglich, wurden derartige Bestimmungen bei Konzentrationen von mindestens 100 µg Protein/0,3 ml Testvolumen durchgeführt, um den Fehler klein zu halten.

5.4. Stabilität der Methylasen

Aus Abb. 13 geht hervor, daß die Aktivität der Methylasen bei Inkubation über 5 Stunden erhalten bleibt. Dem entspricht eine verhältnismäßig gute Haltbarkeit der Methylasen, wenn Kernextrakt bzw. Homogenatüberstand in Eis aufbewahrt wurden. Um den pH-Bereich zu finden, innerhalb dessen die Methylasen haltbar sind, wurden Kernextrakte 36 Stunden lang gegen 10mM Tris- bzw. 10mM Phosphatpuffer mit unterschiedlichem pH-Wert dialysiert, anschließend durch 3stündige Dialyse auf pH 7,6 gebracht und im Test eingesetzt. Abb. 19 zeigt, daß eine Aufbewahrung bei pH

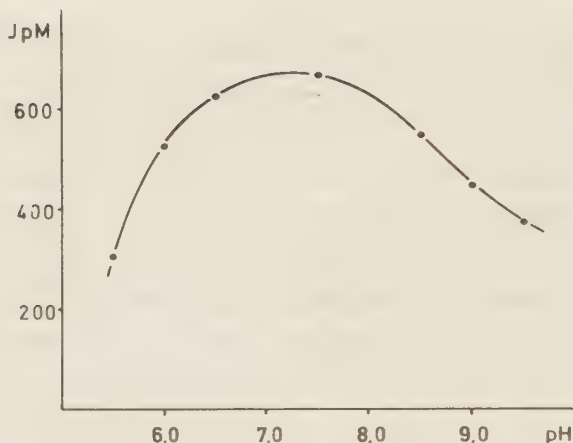


Abb. 19 Haltbarkeit der Methylasen bei verschiedenen pH-Werten. Kernextrakte mit 250 μ g Protein/ml wurden 36 Stunden lang bei 40° gegen 10mM Tris·HCl (pH 7,5-9,5) bzw. 10mM Phosphat (pH 5,5-7,5) und anschließend 3 Stunden lang gegen Tris·HCl (pH 7,6) dialysiert. Alle Puffer enthielten 5mM Merkaptoäthanol und 1mM EDTA. Danach wurde die Aktivität der Methylasen im Standardtest geprüft.

6,5 - pH 8,0 möglich ist. Ein Homogenatüberstand verlor bei pH 7,6 in einer Woche 35 % der Ausgangsaktivität. Nach 24 Stunden war kein Aktivitätsverlust feststellbar. Kernextrakte waren (ebenfalls bei pH 7,6) noch stabiler. Bei Zimmertemperatur betrug der Verlust 15 % in 24 Stunden, jedoch verloren selbst verdünnte Lösungen (0,4 mg Protein/ml) in 4 Tagen bei 0° keine Aktivität. Diese Enzymlösungen können praktisch ohne Verlust verdünnt und in einer Ultrafiltrationszelle (Amicon) wieder konzentriert werden.

Ein gemessener Verlust an Methylasenaktivität kann auf ungleichmäßige Inaktivierung der einzelnen Methylasen beruhen. Darum wurden bei allen Untersuchungen mit ungereinigten Methylasen höchstens 30 Stunden alte Enzymlösungen eingesetzt.

Tab. 10 Einfluß von Metallionen auf die Methylasenaktivität. Kernextrakt mit 50 µg Protein wurde im Standardtest mit 0,5 mM verschiedener Metallsalze (Sulfate, Chloride) inkubiert. Durch die Proteinlösung enthielt der Ansatz 0,17 mM EDTA.

	Aktivität	
	IpM	%
Kontrolle	1480	(100)
Al ⁺⁺⁺	960	65
Ca ⁺⁺	1260	85
Cd ⁺⁺	40	3
Co ⁺⁺	385	26
Cu ⁺⁺	95	6
Fe ⁺⁺	1160	78
Mg ⁺⁺	1130	76
Mn ⁺⁺	270	18
Zn ⁺⁺	10	< 1

5.5. Einfluß zweiwertiger Metallionen

Metallkomplexierende Zusätze zum Methylasentest sind nicht notwendig. Wurde jedoch Kernpulver mit einem Puffer ohne EDTA extrahiert, so betrug die gemessene Aktivität nur 60 % der Kontrolle. Demnach schienen Methylasen gegen Metallionen empfindlich zu sein. Darum wurde der Einfluß einzelner Metallionen im Test untersucht. Tab. 10 zeigt, daß Zink-, Cadmium- und Kupfersalze besonders stark hemmen. Auch Magnesiumionen, die von anderen Autoren (38, 42, 66) zur Stimulation eingesetzt wurden, hemmen unter diesen Bedingungen mit hoher Ionenstärke.

5.6. Methylierungsausmaß

5.6.1. Methyleinbau mit der Zeit

Neben der Aktivität der Methylasen, d. h. der Geschwindigkeit, mit der Methylgruppen auf eine überschüssige Menge RNA übertragen werden, sollte das Ausmaß bestimmt werden, bis zu dem eine begrenzte Menge RNA methyliert werden kann. Aus Standardansätzen, die pro 0,3 ml 1 µg tRNA von E. coli B und 74 bzw. 222 µg Protein aus Kernextrakt enthielten, wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten 0,1 ml-Mengen entnommen und die eingebaute Radioaktivität gemessen. Die Werte entsprechender Ansätze ohne RNA wurden als Blindwerte abgezogen. Ein weiterer Ansatz mit 222 µg Protein/0,3 ml wurde vor Zusatz von SAM 30 min inkubiert.

Abb. 20 a zeigt den Verlauf des Methyleinbaus. Offensichtlich steigt die Höhe des Plateauwertes mit der Konzentration an Protein und damit an Methylasen. Die Methylasen selbst werden im Inkubationszeitraum nicht inaktiviert, denn Zusatz von weiterer tRNA führt zu einem Einbau von Methylgruppen, Zusatz von weiterem Enzym dagegen nicht. Eher scheint die RNA im Laufe der Inkubation inaktiv zu werden, d. h. die Methylierbarkeit zu verlieren, so daß ein hoher Plateauwert von einer raschen Methylierung abhängt. Darauf deutet auch die Kurve, die nach Vorinkubation aufgenommen wurde: Der Endwert liegt unter dem, der mit gleicher Proteinkonzentration, aber ohne Vorinkubation erreicht wurde.

5.6.2. Maßnahmen gegen RNaseneinfluß

Es lag nahe, RNasenwirkung anzunehmen. Darum wurde in einem

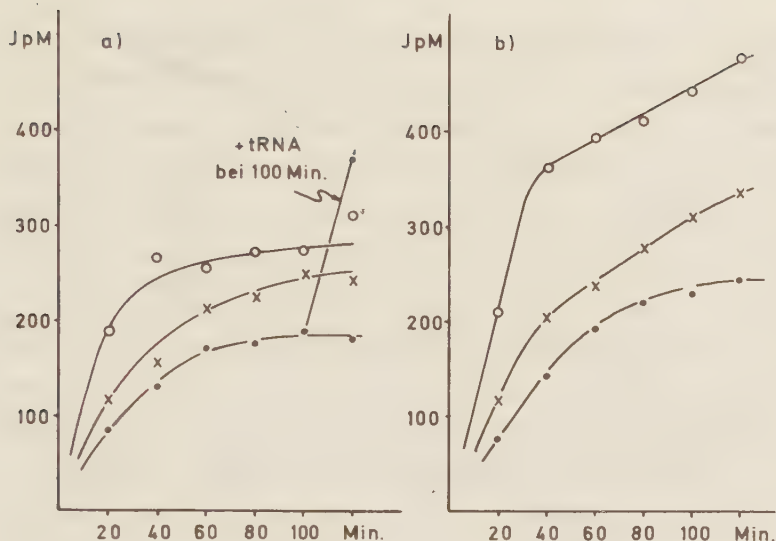


Abb. 20 Ausmaß der tRNA-Methylierung unter verschiedenen Inkubationsbedingungen.

- a) Methyleinbau mit der Zeit. Standardansätze enthielten pro 0,3 ml 1 µg tRNA von E.coli und 74 µg (o—o) bzw. 222 µg Protein (o—o) aus Kernextrakt. Einem Ansatz mit 74 µg Protein/0,3 ml wurden nach 100 min Reaktionszeit weitere 10 µg tRNA zugesetzt. Ein Ansatz mit 222 µg Protein/0,3 ml wurde vor Zusatz von SAM 30 min vorinkubiert (x—x). Zu den angegebenen Zeiten wurden 0,1 ml-Anteile entnommen und die eingebaute Radioaktivität bestimmt. Die Werte entsprechender Ansätze ohne RNA wurden als Blindwerte abgezogen.
- b) wie a), jedoch wurde versucht, RNasen auszuschließen. o—o 25 µg Protein/0,3 ml; o—o 75 µg Protein/0,3 ml; x—x 75 µg Protein/0,3 ml, vorinkubiert (30 min).

neuen Ansatz versucht, RNasen so weit wie möglich auszuschalten. Alle Puffer und Glasgeräte wurden sterilisiert. Der Kernextrakt wurde 2mal 10fach verdünnt und in einer Ultrafiltrationszelle mit einer Rückhaltgrenze von 100 000 Dalton Molekulargewicht auf das Ausgangsvolumen eingengt. Auf diese Weise sollten

RNasen mit niedrigerem Molekulargewicht entfernt werden. Die Endwerte aller drei Kurven stiegen durch diese Maßnahmen (Abb. 20 b), was vielleicht allein auf die Anreicherung der Methylasen zurückzuführen wäre (durch die Ultrafiltration war 40 % des Ausgangsproteins entfernt worden). Relativ zueinander blieben die Endwerte der drei Kurven gleich, c.h. nach wie vor war das gemessene Methylierungsausmaß von der eingesetzten Methylasenmenge abhängig und Vorinkubation reduzierte das Methylierungsausmaß. In einem weiteren Versuch sollten 50fache Mengen ribosomaler RNA von E. coli bzw. tRNA aus Rattenleber die Substrat-RNA von den angenommenen RNasen kompetitiv verdrängen. Auch dadurch wurde jedoch keine Angleichung der Werte erreicht.

5.6.3. Methyleinbau bei steigender Methylasenkonzentration

Eine andere Bestimmung des Methylierungsausmaßes besteht darin, konstante kleine Mengen tRNA mit steigenden Mengen Methylasen zu inkubieren. Die Inkubationszeit liegt fest und ist für alle Ansätze gleich. Trägt man den Methyleinbau gegen die Proteinmenge im Test auf, erhält man eine Kurve, die nach anfänglichem Anstieg in ein Plateau übergehen sollte. Das Plateau umfaßt die Ansätze, bei denen die Methylasenkonzentration größer oder gerade so groß war, wie zur vollständigen Methylierung der tRNA in der gegebenen Zeit nötig.

Nach dieser Methode wurde je 1 μ g tRNA mit steigenden Mengen Homogenatüberstand inkubiert. Abb. 21 zeigt den Verlauf der Werte. Im Gegensatz zu den Erwartungen fällt die Kurve nach anfänglichem Anstieg wieder ab. Bei höheren Konzentrationen an Homogenatprotein wird also der gemessene Methyleinbau ver-

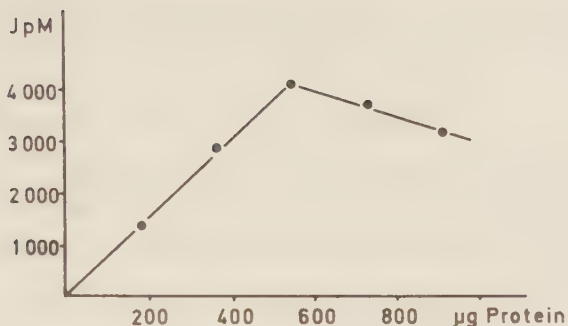


Abb. 21 Methyleinbau bei steigender Methylasenkonzentration. Im Standardtest wurden 1 µg tRNA von E.coli mit steigenden Mengen Homogenatüberstand inkubiert.

ringert. Es ist nicht ersichtlich, ob der Gipfelwert der Kurve tatsächlich dem maximalen Methylierungsausmaß entspricht, das bei der gegebenen tRNA mit den gegebenen Methylasen möglich ist, denn der Störeinfluß, der bei höheren Proteinkonzentrationen sichtbar wird, könnte ein vorzeitiges Abbiegen der Kurve bewirkt haben.

5.6.4. Diskussion

Das Ausmaß, bis zu dem eine gegebene tRNA durch Methylasen in vitro methyliert wird, kann zur Charakterisierung dieser Methylasen benutzt werden. Es ist ein Maß für die Zahl der Positionen, die diese Methylasen an der gegebenen tRNA als methylierbar erkennen. Dies gilt jedoch nur, wenn nicht andere Faktoren mit der Methylierung interferieren. Da im vorliegenden Fall eine Vorinkubation das Methylierungsausmaß senkt und da dieses Ausmaß von der Enzymkonzentration abhängt, ohne daß nachträglicher Enzymzusatz ausgleichend wirkt, muß es einen oder mehrere

solcher Faktoren geben, Darauf deutet auch der Verlauf der Kurve in Abb. 21.

BAGULEY et al. (23) fanden, daß das gemessene Methylierungsausmaß vom Reinigungsgrad der Methylasen abhing und machten RNasen dafür verantwortlich. KERR (66) beschrieb Inhibitoren, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark vertreten sind und die das Methylierungsausmaß in vitro senkten. Welcher Art die Faktoren im vorliegenden Fall sind, kann nicht gesagt werden. Da ihr Einfluß nicht ausgeschaltet werden konnte, wurde die Bestimmung des Methylierungsausmaßes zur Charakterisierung der ungereinigten Methylasen nicht benutzt.

5.7. Methylasenaktivität bei Ratten verschiedenen Alters

Zur Bestimmung eines günstigen Ausgangsmaterials für die Methylasenreinigung wurde die Methylasenaktivität bei Ratten verschiedenen Alters überprüft. Die Aktivität wurde im Überstand eines Leberhomogenats gemessen. In jeder Altersgruppe wurden drei Tiere getrennt untersucht. Tab. 11 zeigt Alter, Gesamtgewicht, Lebergewicht und die Methylasenaktivität in IpM pro mg Überstandprotein. Bei den Aktivitätsunterschieden scheint es sich um nichtsignifikante Schwankungen zu handeln. Auf jeden Fall findet man im untersuchten Zeitraum keine stetige Veränderung der Aktivität. Demnach können auch die größeren Tiere als Ausgangsmaterial für die Reinigung genommen werden.

Im Gegensatz zu diesem Ergebnis fanden HANCOCK et al. (37) bei Mäusen eine stetige Abnahme der Aktivität mit zunehmendem Alter. Von 54 bis 240 Tagen fiel die Aktivität der Methylasen um mehr als 80 %.

Tab. 11 Methylasenaktivität bei Ratten von unterschiedlichem Alter. Im Standardtest wurde Homogenatüberstand mit 400 - 500 µg Protein eingesetzt. In jeder Altersgruppe wurden 3 Tiere untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte der Methylasenaktivität pro mg Protein und die mittleren Fehler der Mittelwerte.

Rattenalter (Tage)	Rattengewicht (g)	Lebergewicht (g)	Methylasen- Aktivität (IpM/mg/h)
48	60	2,0 - 2,3	21 200 ± 200
90	120	3,1 - 3,5	18 100 ± 500
120	200	4,5 - 6,5	23 700 ± 850
220	270	7,5 - 9,5	18 800 ± 1400

5.8. Einfluß des pH auf den Methyleinbau

Als pH-Optimum für das unfraktionierte Methylasengemisch wurde pH 8,2 - 8,5 gefunden (siehe Tab. 9, Abschn. 4.2.2.1.). Abb. 22 zeigt die pH-Kurve der Gesamt-Methylasen aus Kernextrakt. Für

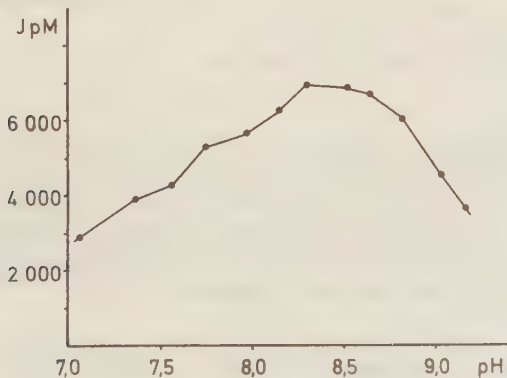


Abb. 22 Einfluß des pH auf die Gesamtaktivität der tRNA-Methylasen. Im Standardtest wurde Kernextrakt mit 90 µg Protein eingesetzt.

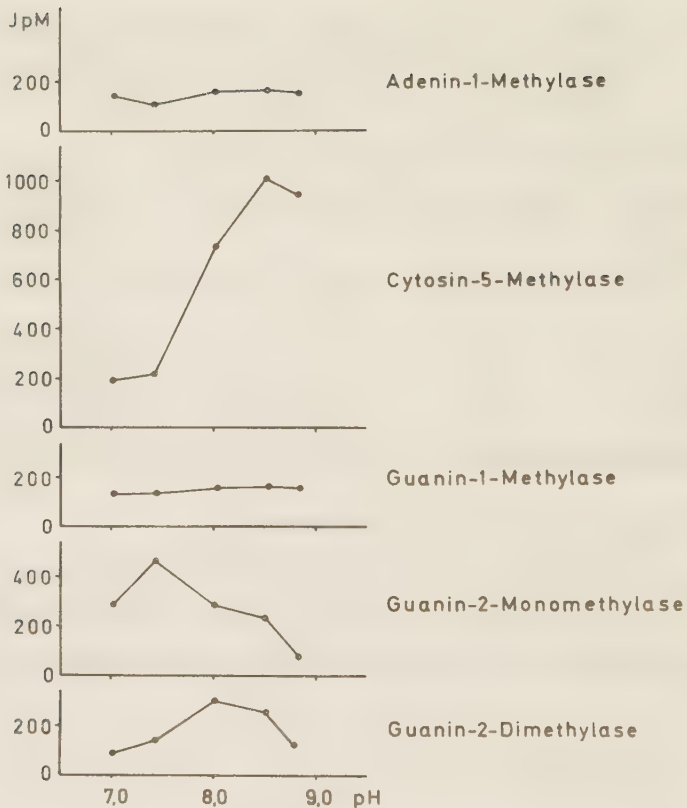


Abb. 23 Einfluß des pH auf die Aktivität einzelner Methylasen. In 3fachen Standardtests wurden 275 µg Kernextraktprotein eingesetzt. Nach 1 Std. Inkubation wurden 0,1 ml-Anteile entnommen und die eingebaute Radioaktivität bestimmt. Aus dem Rest der Ansätze wurde die RNA isoliert und eine Basenanalyse durchgeführt. Die Basenanalyse ergab den Anteil der einzelnen Methylasen an der Gesamtaktivität.

die Reinigung einzelner Methylasen interessierten deren pH-Optima. Um diese zu bestimmen, wurden bei verschiedenen pH-Werten die Gesamtaktivität der unfractionierten Methylasen und das Verhältnis der gebildeten Methylbasen ermittelt. Durch

Multiplikation der Gesamtaktivität mit dem relativen Anteil einzelner Basen wurden die absoluten Aktivitäten einzelner Methylasen errechnet.

Abb. 23 zeigt die pH-Kurven der verschiedenen Methylasenaktivitäten. Während die 1mA- und 1mG-bildenden Enzyme im untersuchten Bereich kein deutliches Optimum zeigen, haben die Cytosin-5- und die Guanin-2-Methylasen ausgeprägte Profile. Für das pH-Optimum des unfractionierten Gemisches ist offensichtlich vor allem die Cytosinmethylase verantwortlich. Bei der Untersuchung einzelner Methylasen müßte jedoch nur für Guanin-2-Monomethylase pH 7,4 statt 8,5 als Inkubations-pH gewählt werden.

5.9. Aktivität der unfractionierten Methylasen gegenüber spezifischen tRNAs

Homogenatüberstand wurde mit verschiedenen spezifischen tRNAs inkubiert. Die tRNAs wurden im Überschuß eingesetzt, so daß die Aktivität des Enzyms gegenüber den verschiedenen Substraten bestimmt werden konnte. Mit den Reaktionsprodukten wurde eine Basenanalyse durchgeführt. Tab. 12 zeigt das Ergebnis. Danach ist die unfractionierte tRNA von E. coli das beste Substrat für das Methylasengemisch. Die Aktivität gegenüber den anderen tRNAs schwankt stark.

Zum besseren Verständnis der folgenden Diskussion zeigt Abb. 24 die Tyrosin-tRNA aus Hefe, welche alle hier besprochenen Methylbasen in typischen Positionen enthält. Die Bezifferung der Positionen in der tRNA-Sequenz erfolgte nach STAEHELIN (82).

Tab. 12 Aktivität der unfractionierten Methylasen gegenüber spezifischen tRNAs. In 3fachen Standardansätzen (0,9 ml) wurden 900 µg Protein aus Homogenatüberstand mit 150 µg Gesamt-tRNA von E.coli oder Hefe bzw. mit 30 µg spezifischer tRNA inkubiert. Nach der Inkubation wurden 0,1 ml-Anteile entnommen zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität. Aus dem Rest der Ansätze wurde die RNA isoliert und eine Basenanalyse durchgeführt.

Substrat	Aktivität		% - Anteile einzelner Methylbasen am Reaktionsprodukt				
	IpM	relativ	1mA	5mC	1mG	2mG	2mmG
Gesamt-tRNA E.coli	1335	100 %	18	27	5	31	18,5
Gesamt-tRNA Hefe	164	12 %	10	37	14,5	35	2,5
tRNA ^{fMet} E.coli	425	32 %	2,5	52	38	6,5	-
tRNA ^{Glu} E.coli	1010	75 %	3	92	4,5	-	-
tRNA ^{Phe} E.coli	250	19 %	6,5	46	-	45	-
tRNA ^{Phe} Hefe	278	21 %	1	91	3	5	1
tRNA ^{Try} B.stearoth.	36	3 %	nicht untersucht				
tRNA ^{Val} E.coli	296	22 %	2,5	66	15	15	1,5

5.9.1. Bildung von 1-Methyladenin

Bei keiner der eingesetzten spezifischen tRNAs wurden nennenswerte Mengen 1mA gebildet. Dies ist erstaunlich, denn die Inkubationsbedingungen erlauben die Bildung von 1mA, wie die Analyse der unfractionierten tRNA von E. coli zeigt. Auch enthalten alle

hält. Auf die hohe Cytosinmethylierbarkeit von $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{Glu}}$ wies schon PEGG (84) hin. Dieser Autor fand bei $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{Glu}}$ außerdem Bildung von 1mA, die hier nicht beobachtet wurde.

5.9.3. Bildung von 1-Methylguanin

1mG ist bei den bekannten Hefe-tRNAs in Position 9 zwischen Aminoacyl-Arm und DHU-Arm und in Position 42 neben dem Anticodon gefunden worden. Von den hier untersuchten tRNAs hat keine ein Guanin neben dem Anticodon und nur $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{fMet}}$ ein Guanin in Position 9. Die gute Substrateigenschaft gerade dieser tRNA für Guanin-1-Methylase legt nahe, daß diese Rattenmethylase die Position 9 methyliert.

5.9.4. Bildung von 2-Methylguanin

2mG müßte nach den Ergebnissen von KUCHINO et al. (18) an den E. coli-tRNAs für Methionin, Valin und Phenylalanin gebildet werden. Das trifft für die letzten beiden auch zu. Warum an $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{fMet}}$ so wenig 2mG gebildet wird, ist nicht klar, Vielleicht liegt es an den Inkubationsbedingungen. KUCHINO et al. inkubierten bei pH 8,0 (im Gegensatz zu pH 8,5 hier). $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{fMet}}$ wurde durch eine andere Guanin-2-Methylase methyliert als $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{Val}}$ und $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{Phe}}$. Das Optimum der unfractionierten Guanin-2-Methylasen liegt zwischen 7 und 8 (siehe Abb. 23).

5.9.5. Bildung von 2-Dimethylguanin

2mmG ist bislang in tRNAs nur zwischen DHU- und Anticodon-Arm gefunden worden. Von den hier eingesetzten tRNAs hat nur $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{fMet}}$ in dieser Position ein Guanin. Diese tRNA eignet sich nach KUCHINO et al. (18) nicht als Substrat für die Guanin-2-

Dimethylase von Ratten. So ist es nicht verwunderlich, wenn 2mmG bei keiner der hier eingesetzten tRNAs gefunden wurde.

6. CYTOSIN-5-METHYLASE

6.1. Abtrennung des Enzyms von anderen tRNA-Methylasen

Von den tRNA-Methylasen der Säugetiere sind bislang nur die Adenin-1-Methylase (71) und drei Guanin-2-Methylasen (18) abgetrennt und angereichert worden. Von den übrigen Methylasen wird in vitro vor allem 5-Methylcytosin gebildet. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese cytosinmethylierende Aktivität abzutrennen. Ob es sich dabei um ein oder um mehrere Enzyme handelt, ist ungewiß. Der Einfachheit halber wird diese Enzymfraktion im Folgenden "die Cytosin-5-Methylase" genannt werden.

6.1.1. Maßnahmen zum Schutz des Enzyms

Eine Schwierigkeit der Reinigung war die Empfindlichkeit der tRNA-Methylasen. Sie verloren anfangs durch jeden Reinigungsschritt 90 % und mehr an Aktivität, obwohl sie im Rohsaft und auch nach jedem Reinigungsschritt relativ stabil waren. Die Ausbeuten konnten durch eine Reihe von Maßnahmen verbessert werden. Dazu gehörte der Zusatz von Glycerin zu allen Puffern. Bei der Aufbewahrung von Enzymlösungen ist Glycerin jedoch ohne Einfluß; im Test hemmt es die Methylasenaktivität. Bei der Ammoniumsulfatfällung war die langsame Zugabe des Salzes wichtig. Schonender als festes Ammoniumsulfat war eine bei 4° gesättigte Lösung, die auf pH 6,0 eingestellt wurde (gemessen an 1 : 20 verdünnten Lösungen).

Die größten Verluste ergaben sich bei der Chromatographie an TEAE-Zellulose. Zumindest teilweise waren dafür Verunreinigungen durch Schwermetallionen verantwortlich. Bei Untersuchung

verschiedener Chargen von DEAE- und TEAE-Cellulose wurde die beste Methylassenausbeute mit den Chargen erzielt, die den geringsten Schwermetallgehalt aufwiesen (gemessen durch komplexometrische Titration der veraschten Cellulose). Um diese Verunreinigungen möglichst weitgehend zu entfernen, wurde die Cellulose nach dem üblichen Waschen mit 0,5 N NaOH und 0,5 N HCl mindestens eine Woche in 10mM EDTA, pH 10,5, eingeweicht. Auch mit so gereinigter TEAE-Cellulose durften die Methylassen nur kurze Zeit in Kontakt sein. Darum wurden feine Partikel aus der Cellulose sorgfältig entfernt und der Ionenaustauscher als breite, aber flache Säule gepackt, die mit einem steilen Salzgradienten rasch eluiert werden konnte. Nachteile dieses Verfahrens waren jedoch mäßige Trennschärfe und schlechte Reproduzierbarkeit.

Auch bei der Chromatographie über Sephadex war eine Vorbehandlung des Gels mit 10mM EDTA notwendig. Auf so gereinigten Säulen waren die Methylassen relativ stabil, wenn man die lange Laufzeit von drei Tagen bedenkt.

6.1.2. Ammoniumsulfatfällung

Etwa 200 ml Homogenatüberstand wurde mit Glycerin bis zu einer Volumenkonzentration von 14 % versetzt. Innerhalb einer Stunde wurden dann unter Rühren 1,04 Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung zugepumpt. So wurden 51 % der Sättigung erreicht, wenn man den Einfluß des Glycerins auf die Löslichkeit des Salzes nicht berücksichtigt. Diese und alle anderen Arbeiten wurden im Kühlraum bei 2 - 6° durchgeführt. Nach Zugabe der Salzlösung wurde eine Stunde gerührt und der Niederschlag dann

abzentrifugiert (20 min bei 27 000 g). Dieser Niederschlag enthielt einen Großteil der Adenin-1- und der Guanin-2-Methylasen (siehe Abb. 25). Zum Überstand wurden, wieder innerhalb einer Stunde, 0,31 Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung gepumpt (bis zum nominellen Sättigungsgrad von 63 %) und nach einer weiteren Stunde Rühren abzentrifugiert. Der letzte Niederschlag wurde in 10 - 20 ml Grundpuffer gelöst (33mM Tris-acetat, pH 8,0; 3,3mM EDTA; 10mM Merkaptoäthanol in 30 Vol % Glycerin), über Nacht gegen 1 l des gleichen Puffers dialysiert und dann durch Zentrifugation vom ungelösten Material befreit.

6.1.3. Chromatographie auf TEAE-Cellulose

Die dialysierte Lösung des zweiten Ammoniumsulfat-Präcipitates wurde mit 1/5 Vol 300mM Kaliumacetat in Grundpuffer versetzt und auf eine TEAE-Cellulose-Säule (3 - 5 cm hoch, 5 cm breit) gegeben. Die Säule war mit 50mM Kaliumacetat in Grundpuffer äquilibriert. Bei einer Pumpgeschwindigkeit von 200 ml/Std. wurden dann weitere 20 ml 50mM Kaliumacetat, 120 ml eines Gradienten 50 - 300mM Kaliumacetat und 50 ml 300mM Kaliumacetat, alles in Grundpuffer, durch die Säule gepumpt. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 4 ml aufgefangen. 50 µl jeder Fraktion wurden auf Methylasenaktivität im Kurztest untersucht. Fraktionen mit mehr als 30 - 50 % der maximalen Aktivität wurden gesammelt und über eine Sephadex G 25-Säule in Glycerin-freien Extrakt-puffer gebracht (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 5mM Merkaptoäthanol; 1mM EDTA). Nach Entfernen des Glycerins ließen sich diese Fraktionen in einer Amicon-Ultrafiltrationszelle (mit UM 20E Membran) schnell einengen.

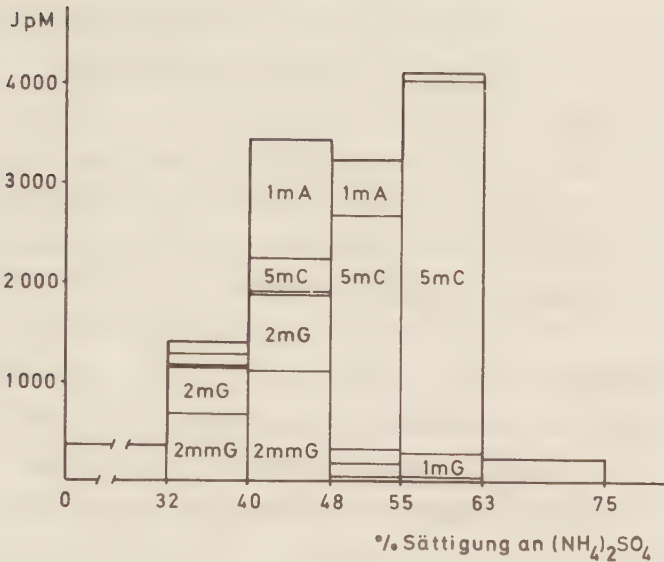


Abb. 25 Fraktionierte Fällung der Methylasen mit Ammoniumsulfat. 2 ml Kernextrakt mit 20 mg Protein wurden stufenweise mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, die Niederschläge nach jeweils 15 min abzentrifugiert, in 0,5 ml Extraktpuffer aufgenommen und gegen Extraktpuffer dialysiert. Je 150 μl wurden in 3fachen Standardtests eingesetzt. Nach Inkubation wurde mit einem Teil jedes Ansatzes die eingebaute Radioaktivität bestimmt und mit dem anderen Teil eine Basenanalyse durchgeführt. Aus der Basenanalyse ergab sich der Anteil der einzelnen Methylasen an der Gesamtaktivität.

6.1.4. Chromatographie auf Sephadex G 150

Das entsalzte, eingeeengte Eluat wurde über Nacht gegen Extrakt-puffer in 30 % (V/V) Glycerin dialysiert, wodurch sich das Volumen weiter reduzierte, und dann auf eine Sephadex G 150-Säule (95 cm hoch, 1 cm breit) aufgetragen, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war. Bei einer Pumpgeschwindigkeit von 1,5 ml/Std. wurde 2mal rezykliert, so daß das Protein die Säule

insgesamt 3mal passierte. Dann wurde in 1,5 ml-Fractionen eluiert und die Fractionen mit mehr als 30 % der Maximal-Aktivität gesammelt. In den Fällen, wo dem Hauptaktivitäts-gipfel eine "Schulter" vorausging, wurden deren Fractionen verworfen. Die gesammelten Fractionen wurden über Sephadex G 25 in glycerinfreien Extrakt-puffer gebracht und in einer Ultrafiltrationszelle eingeengt.

6.1.5. Ergebnis

Tab. 13 zeigt die Ausbeuten und Anreicherungen bei einer typischen Reinigung. Die Werte schwankten von Mal zu Mal. Durch die drei Reinigungsschritte wurde jedoch regelmäßig eine Methylasenpräparation gewonnen, die zu 90 % oder mehr aus Cytosin-5-Methylase bestand.

Tab. 13 Schema einer typischen Reinigung der Cytosin-5-Methylase.

Reinigungs- schritt	Protein (mg)	Methylasen- aktivität IpM/mg Pro- tein/Std.	Anteil der Cytosin-5- Methylase	Ausbeute an Cytosin- 5-Methylase
Homogenat- überstand	3 900	31 000	28 %	(100 %)
1. (NH ₄) ₂ SO ₄ - Niederschlag	1 310	41 000	9 %	13 %
2. (NH ₄) ₂ SO ₄ - Niederschlag	910	31 000	69 %	53 %
TEAE-Cellulose	36	94 000	85 %	8 %
Sephadex G 150	7	176 000	96 %	3,4 %

6.2. Eigenschaften der Cytosin-5-Methylase

6.2.1. Verdünnungsinaktivierung

Abb. 26 zeigt den Methyleinbau bei steigenden Konzentrationen an Cytosin-5-Methylase. Die Aktivität pro mg Protein hängt von der Enzymkonzentration ab, wie es schon beim ungereinigten Methylasengemisch beobachtet wurde, d. h. die Cytosin-5-Methylase unterliegt der Verdünnungsinaktivierung. Dafür gibt es die gleichen Erklärungsmöglichkeiten, wie sie bei der Charakterisierung des ungereinigten Methylasengemisches genannt wurden (siehe 5.3.2). Wenn man ausschließt, daß die Verdünnungsinaktivierung durch toxische Verunreinigungen bedingt ist, muß das aktive Enzym ein Komplex sein, der aus Untereinheiten oder

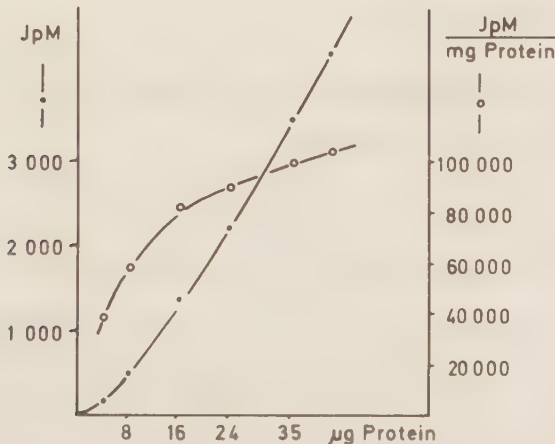


Abb. 26 Einfluß der Konzentration der Cytosin-5-Methylase auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Im Standardtest wurden steigende Mengen einer Enzympräparation eingesetzt, deren Aktivität zu 94 % aus Cytosin-5-Methylase bestand. Angegeben sind die Aktivität als IpM (●—●) und die spezifische Aktivität als IpM/mg Protein (○—○).

aus Protein und **niedermolekularem** Kofaktor besteht. Unter Inkubationsbedingungen setzt sich dieser Komplex rasch ins Gleichgewicht mit seinen **freien** Komponenten, denn eine langsame Inaktivierung wurde ja schon beim Methylasengemisch nicht beobachtet. Die Cytosin-5-Methylase ist über drei verschiedene Reinigungsschritte angereichert und dabei noch ausführlich dialysiert und 2mal über Sephadex G 25 entsalzt worden. Ein Kofaktor hätte während dieser Schritte sehr fest ans Enzym gebunden sein müssen, um die Fraktion der gereinigten Methylase zu erreichen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß ein vermuteter Kofaktor unter Inkubationsbedingungen so gänzlich andere Bindungseigenschaften zeigt als bei der Reinigung. Es liegt aber nahe, anzunehmen, daß das Enzym aus inaktiven Untereinheiten besteht.

6.2.2. Zentrifugation der Cytosin-5-Methylase im Saccharosegradienten

Wenn ein Protein in zwei Assoziationsformen auftritt, z.B. als Monomer und als Dimer, und wenn die beiden Formen sich miteinander rasch ins Gleichgewicht setzen können, dann wird ein Gemisch aus beiden Formen bei Zentrifugation als eine Zone sedimentieren (85). Die Sedimentationsgeschwindigkeit hängt dann vom relativen Anteil der beiden Formen ab und ist im Extremfall gleich der Sedimentationsgeschwindigkeit der Form mit niedrigerem bzw. der mit höherem Molekulargewicht.

Wenn die Cytosin-5-Methylase beim Verdünnen in Untereinheiten zerfällt, dann müßte die Sedimentationsgeschwindigkeit vom Verdünnungsgrad abhängen. Dabei ist zu beachten, daß die vermuteten Untereinheiten keine oder nur sehr geringe Methylasen-

aktivität zeigen, und die Enzymzone daher nur anhand des verbleibenden Anteils an komplettem Enzym nachgewiesen werden kann. Die Beobachtungen können daher nur innerhalb eines relativ kleinen Konzentrationsbereiches durchgeführt werden.

100 bzw. 20 μg Enzymprotein wurden mit je 20 μg Alkoholdehydrogenase aus Hefe zentrifugiert. Die Alkoholdehydrogenase mit einem Molekulargewicht von 150 000 diente als Referenzprotein. Abb. 27 zeigt die Aktivitätsverteilung nach der Zentrifugation. Bei höherer Enzymkonzentration ist die Aktivität fast so schnell sedimentiert wie die Alkoholdehydrogenase. Bei geringerer Enzymkonzentration bleibt die Aktivität deutlich zurück.

Die eingesetzte Methylasenaktivität bestand zu mehr als 95 %

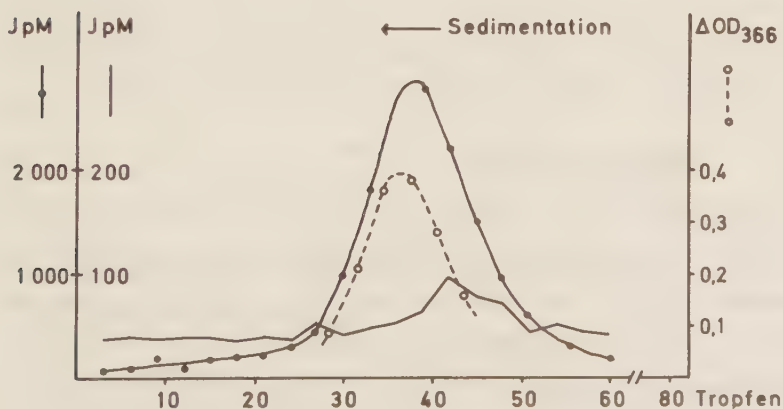


Abb. 27 Zentrifugation der Cytosin-5-Methylase im Saccharosegradienten. 100 μg (●—●) bzw. 20 μg Protein (—) der gereinigten Cytosin-5-Methylase wurden zusammen mit Alkoholdehydrogenase (o--o) zentrifugiert. Die angegebene Methylasenaktivität wurde im Kurztest bestimmt und schließt den Blindwert ein.

aus Cytosin-5-Methylase. Trotzdem war es denkbar, daß die Cytosin-5-Methylase beim Verdünnen völlig inaktiviert wird und die restlichen anderen Methylasen den Aktivitätsgipfel bilden. Basenanalyse der im Test methylierten RNA zeigte jedoch, daß der langsamer sedimentierende Gipfel zu über 75 % aus Cytosin-5-Methylase bestand. Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist also tatsächlich vom Verdünnungsgrad abhängig.

MARTIN und AMES wiesen auf die theoretische Möglichkeit hin, daß ein Enzym bei höherer Proteinkonzentration durch Anlagerung an Fremdprotein schneller sedimentieren könnte (86). Die Autoren selbst setzten für ihre Experimente höhere Proteinkonzentrationen ein als bei dem hier beschriebenen Experiment und beobachteten keine Anlagerung. Das Ergebnis der Zentrifugation macht es also wahrscheinlich, daß die Cytosin-5-Methylase in Untereinheiten zerfallen kann. Der Beweis dafür, und vor allem die Charakterisierung der Untereinheiten kann jedoch erst mit ganz reinem Enzym durchgeführt werden.

6.2.3. Methylierungsausmaß

Mit der gereinigten Cytosin-5-Methylase wurde das Methylierungsausmaß an unfractionierter tRNA von E. coli bestimmt. Wie im Abschnitt 5.6.3. erläutert, wurden je 0,5 µg tRNA mit steigenden Mengen Cytosin-5-Methylase inkubiert. Abb. 28 zeigt, daß die Kurve ein Plateau bildet und nicht abfällt wie bei unreinigten Methylasen. Demnach erscheint hier eine Berechnung des Methylierungsausmaßes sinnvoll.

Der Plateauwert beträgt 1800 IpM, das entspricht 28 pMol Methylgruppen (bei einer Zählausbeute von 27 % und einer spezifischen

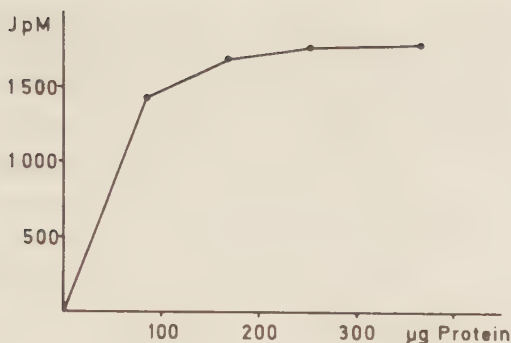


Abb. 28 Erschöpfende tRNA-Methylierung durch Cytosin-5-Methylase. In Standardansätzen von 0,15 ml Volumen wurden je 0,5 µg tRNA von E.coli (von höhermolekularer RNA gereinigt) mit steigenden Mengen Cytosin-5-Methylase inkubiert.

Radioaktivität des ^3H -SAM von 104 Ci/Mol). Von den 28 pMol Methylgruppen entfallen nach der Basenanalyse 77 % auf 5mC. 0,5 µg tRNA entsprechen 20 pMol (bei einem mittleren Molekulargewicht der tRNA von 25 000). So errechnet sich ein $\bar{x}$ Methylierungsausmaß von 1,05 Mol 5mC/Mol tRNA. Es wird also im Durchschnitt an jedem tRNA-Molekül ein Cytosin methyliert.

6.2.4. Aktivität der Cytosin-5-Methylase gegenüber spezifischen tRNAs

Entsprechend dem unter 5.9. beschriebenen Experiment wurde Cytosin-5-Methylase mit verschiedenen spezifischen tRNAs inkubiert. Tab. 14 zeigt das Ergebnis.

Die Aktivität der Cytosin-5-Methylase gegen die verschiedenen Substrate schwankt stark. $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{Glu}}$ wird sehr viel besser, alle anderen tRNAs schlechter methyliert als gemischte tRNA

Tab. 14 Aktivität der Cytosin-5-Methylase gegenüber spezifischen tRNAs. In 3fachen Standardansätzen (0,9 ml) wurden 100 µg der Cytosin-5-Methylasenpräparation mit 150 µg Gesamt-tRNA von E.coli oder Hefe bzw. mit 30 µg spezifischer tRNA inkubiert. Nach der Inkubation wurden 0,1 ml-Anteile entnommen zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität. Aus dem Rest der Ansätze wurde die RNA isoliert und eine Basenanalyse durchgeführt.

Substrat	Aktivität IpM	relative Aktivität	Anteil von 5mC am Reaktionsprodukt
Gesamt-tRNA E.coli	1 200	100 %	94 %
Gesamt-tRNA Hefe	205	17 %	81 %
tRNA ^{fMet} E.coli	511	43 %	91 %
tRNA ^{Glu} E.coli	2 247	185 %	94 %
tRNA ^{Phe} E.coli	346	30 %	84 %
tRNA ^{Phe} Hefe	546	46 %	89 %
tRNA ^{Trp} B.stearoth.	95	8 %	nicht untersucht
tRNA ^{Val} ₁ E.coli	841	70 %	92 %

von E. coli. Fast unmethylierbar ist tRNA^{Tryp}_{B.stearoth.}. In allen Fällen beruht die gemessene Aktivität im Wesentlichen auf der Bildung von 5mC, wie die Basenanalyse zeigt.

5mC wurde bei den bisher bekannten Eukaryoten-tRNAs zwischen Extra-Arm und TΨC-Arm gefunden (70): meistens in der Position 63, in einigen Fällen in Position 64, in einem Fall in beiden

Positionen zugleich (87). Einmal ist 5mC außerdem im Anticodon-Arm gefunden worden (70). STAEHELIN (82) stellte an den bisher bekannten tRNAs fest, daß Cytosin in Position 63 immer dann methyliert ist, wenn der Dihydrouracil-Arm (DHU-Arm) 3 Basenpaare (anstatt 4) enthält.

Alle im Test mit der Cytosin-5-Methylase eingesetzten tRNAs haben in Position 63 ein Cytosin, nicht aber in Position 64. (Die Struktur von tRNA^{Tryp}_{B.stearoth.} ist allerdings unbekannt). tRNA^{Glu}_{E.coli} hat 3 Basenpaare im DHU-Arm, die anderen tRNAs 4. Es ist also denkbar, daß die gereinigte Cytosin-5-Methylase eine Präferenz für tRNAs mit 3 Basenpaaren im DHU-Arm besitzt, entsprechend der Beobachtung von STAEHELIN.

Diese Überlegung unterstellt, daß die gereinigte Cytosin-5-Methylase zwischen Extra- und TΨC-Arm methyliert. SHERSHNEVA et al. (88) fanden, daß die unfractionierten Methylasen aus Rattenleber zwischen Extra- und TΨC-Arm 5mC bilden können. Auch enthält die eine bekannte Ratten-tRNA 5mC in Position 63 (70). Die Gesamt-tRNA der Ratte enthält jedoch im Durchschnitt 1,5 Moleküle 5mC pro tRNA-Molekül (23). Es werden also außer Position 63 noch andere Punkte der RattentRNA cytosinmethyliert. Demnach muß noch geklärt werden, wo die gereinigte Cytosin-5-Methylase angreift, und ob es eventuell noch andere Enzyme gibt, die 5mC bilden können.

6.3. Diskussion

Mit den hier beschriebenen Methoden ist erstmalig die Abtrennung der Cytosin-5-Methylase von anderen Methylasen gelungen. Dabei zeigte das Enzym eine starke Empfindlichkeit gegen alle

Reinigungsprozeduren. Eine Ursache scheinen Metallionen zu sein, die sich nicht ganz entfernen lassen. Die Natur weiterer Ursachen ist unbekannt.

Schon andere Autoren haben auf die Schwierigkeit der Reinigung von tRNA-Methylasen hingewiesen (24, 89). Es wurde vorgeschlagen, die einzelnen Methylasen ohne vorherige Abtrennung dadurch zu messen, daß man sie mit Substraten inkubiert, die von den anderen Methylasen nicht akzeptiert werden (89). Wie im Abschnitt 5.9. beschrieben, gibt es tRNAs, an denen auch mit einem Methylasengemisch praktisch nur eine Art von Methylbasen gebildet wird.

Die Auftrennung und Reinigung der tRNA-Methylasen ist jedoch aus zwei Gründen unumgänglich. Erstens ist nur so die Zahl der vorhandenen Methylasen zu bestimmen. Bilden nämlich mehrere Enzyme die gleiche Methylbase, wie es für Uracil- und Guanin-methylasen beschrieben wurde (17, 18), so werden diese Enzyme ohne Fraktionierung nur als eine Aktivität erkannt. Zweitens können die Eigenschaften der einzelnen Methylasen im Rohextrakt nicht zuverlässig bestimmt werden. Störquellen, wie Inhibitoren (35, 90), RNasen (23) oder andere SAM-verbrauchende Enzyme (91, 92) beeinflussen die Methylasenreaktion. Die Unmöglichkeit, mit Rohextrakt das Methylierungsausmaß zu bestimmen, ist ein Beispiel dafür (siehe Abschnitt 5.6.).

Die Eigenschaften der Methylasen müssen aber bekannt sein, wenn man z. B. den Mechanismus der RNA-Methylierung klären will, wenn die Regulation der Methylasen und ihre mögliche Beteiligung an der Regulation anderer Systeme untersucht

werden soll oder wenn man die Frage endgültig beantworten will, ob zwischen den Methylasen aus Normalgewebe und denen aus Tumoren ein Unterschied besteht.

Es wurden einige Eigenschaften der gereinigten Cytosin-5-Methylase bestimmt. Eine reversible Verdünnungsinaktivierung konnte mit einem Zerfall des Enzyms in inaktive Untereinheiten erklärt werden. Berichte über Untereinheiten von tRNA-Methylasen lagen bislang weder von Pro- noch von Eukaryoten vor.

Die Inkubation mit kleinen Mengen RNA zeigte, daß eine Bestimmung des Methylierungsmaßes mit dieser Enzympräparation möglich ist. Das Ausmaß von 1,05 Mol 5mC pro Mol E. coli-tRNA ist sehr ähnlich dem Wert von 0,9, den BAGULEY et al. (23) mit Adenin-1-Methylase an E. coli-tRNA fanden.

Die Bestimmung der Substratspezifität, d. h. der Aktivität gegenüber verschiedenen spezifischen tRNAs ergab Anhaltspunkte für den Ort der Methylierung an der tRNA.

Aus den Befunden ergeben sich einige Fragen und Anknüpfungspunkte für weitere Experimente. Da die Cytosin-5-Methylase fast so schnell sedimentiert wie die Alkoholdehydrogenase, ihr Molekulargewicht also wahrscheinlich über 100 000 liegt, ist die Zusammensetzung des Enzyms aus Untereinheiten nicht erstaunlich. Interessant ist dagegen die leicht erfolgende Dissoziation. Es ist zu fragen, ob dies allein den Testbedingungen zuzuschreiben ist, oder ob der Effekt physiologische Bedeutung hat, vielleicht für die Regulation des Enzyms. Inaktivierungen von Enzymen durch Zerfall in Untereinheiten sind beschrieben worden (Übersicht 93). Meist wurde das

Dissoziationsgleichgewicht durch niedermolekulare Kofaktoren beeinflusst. Es wäre also sinnvoll, nach Substanzen zu suchen, die die Verdünnungsinaktivierung der Cytosin-5-Methylase beeinflussen können.

Weiterhin ist die Natur der Untereinheiten zu klären. Handelt es sich um identische Untereinheiten, könnte man mit mehreren aktiven Zentren rechnen. Sind die Untereinheiten verschiedenartig, wäre ein funktioneller Komplex aus substraterkennendem und reaktionskatalysierendem Protein denkbar. Solche Komplexe werden für bestimmte bakterielle DNA-Methylasen angenommen (94). Allerdings ist die Untersuchung kaum möglich, so lange die Cytosin-5-Methylase nicht in reiner Form vorliegt.

Die Position der Methylierung an der tRNA kann dagegen mit der vorliegenden Enzympräparation bestimmt werden. Durch Methylierung spezifischer tRNAs, deren Sequenz bekannt ist, Abbau mit spezifischen RNasen und Bestimmung der Länge der Oligonucleotide, die die Methylgruppen enthalten, läßt sich die methylierte Position erkennen. So kann auch geklärt werden, ob diese Enzympräparation mehr als eine Position an tRNA methyliert. Ist dieses nicht der Fall, muß man unter den bei der Reinigung verworfenen Proteinfractionen nach weiteren Cytosin-5-Methylasen suchen, da ja Ratten-tRNA im Durchschnitt mehr als ein 5mC pro Molekül enthält.

Gemessen an der Substratspezifität scheint jedoch die abgetrennte Enzymfraktion alle Cytosin-5-Methylase(n) zu enthalten, die im Homogenatüberstand erfaßt wird. Ordnet man nämlich die verschiedenen im Test eingesetzten tRNAs nach der Radioaktivität, die im 5mC gefunden wurde (Tab. 12 und 14), ergibt sich

bei Homogenatüberstand und bei der abgetrennten Cytosin-5-Methylase die gleiche Reihenfolge. (Eine Ausnahme, die auf Testungenauigkeiten beruhen könnte, macht nur $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{Val}}$, die einmal vor, einmal hinter $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{fMet}}$ und $\text{tRNA}_{\text{Hefe}}^{\text{Phe}}$ steht.) Fände man also, daß die abgetrennte Cytosin-5-Methylase mehr als eine Methylgruppe überträgt, müßte eine Auftrennung in mehrere Enzyme versucht werden. Gelänge dies nicht, dann handelte es sich um die erste bekannte Methylase, die an tRNA mehr als eine Position erkennt.

7. METHODEN

7.1. pH-Messung

Alle pH-Werte wurden mit einer Glaselektrode bei Zimmertemperatur (23 - 25°) bestimmt.

7.2. Radioaktivitätsmessung

Radioaktivität wurde mit dem Szintillationsspektrometer Tricarb 3003 der Firma Packard gemessen. Folgende Zählflüssigkeiten wurden benutzt:

Toluol-Szintillatorlösung: 4,0 g PPO = 2,5-Diphenyloxazol und 0,1 g POPOP = 2,2'-p-Phenyl- bis (5-phenyloxazol) in 1 l Toluol. Dioxan-Szintillatorlösung: 7,0 g PPO, 0,5 g POPOP, 125 ml Anisol, 125 ml Dimethoxyäthan, 750 ml Dioxan.

7.3. Bestimmung von Protein nach LOWRY et al. (95)

Reagenzien: A) frisch hergestellte Mischung von 1 Vol. einer Lösung von 1,23 g Kaliumnatriumtartrat und 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Wasser mit 50 Vol. 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH.
B) FOLIN-CIOCALTEU Phenolreagenz, mit Wasser verdünnt auf N Säuregehalt.

Die Probe mit 20 - 200 µg Protein wurde mit Wasser auf 2 ml aufgefüllt, mit 5 ml A versetzt und gut gemischt. Nach genau 10 min wurden 0,5 ml B zugesetzt, wiederum gut durchmischt und nach weiteren 30 min die Extinktion bei 546 nm gemessen. Als Vergleichsprotein diente der Serumstandard LabTrol (Asid GmbH). Die Extinktion war nicht proportional der Proteinmenge, darum wurden verschiedene Mengen Standard eingesetzt und die Probe auf den nächstliegenden Standard bezogen.

7.4. Bestimmung von Ribose mit Orcin (96)

Reagenz: Mischung von 167 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml 37 % HCl mit 210 mg Orcin in 3,5 ml Athanol. In einer dunklen Flasche war das Reagenz 10 Tage lang haltbar.

Die Probe mit 20 - 200 µg RNA bzw. RNA-Hydrolysat wurde mit Wasser auf 1,5 ml aufgefüllt und mit 1,5 ml Reagenz 20 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Extinktion bei 660 nm gemessen. Als Vergleichsstandard diente unfraktionierte Hefe-RNA.

7.5. Bestimmung von Desoxyribose mit Diphenylamin (97)

Reagenz: 1 g Diphenylamin in 100 ml Eisessig gemischt mit 2,75 ml 96 % H_2SO_4 . Das Reagenz war in dunkler Flasche 10 Tage lang haltbar.

Eine Probe mit 50 - 500 µg DNA bzw. DNA-Hydrolysat wurde mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt und mit 2 ml Reagenz 10 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Extinktion bei 600 nm gemessen. Als Vergleichsstandard diente Herings-DNA.

7.6. Bestimmung von DNA und RNA in Gewebeproben

RNA und DNA wurden nach SCHMIDT und THANNHAUSER (98) getrennt: 0,6 ml Gewebshomogenat (bzw. Suspension von Gewebspulver) wurden mit 1,4 ml 10 % TCA versetzt und nach 1 Stunde Eiskühlung zentrifugiert. Das Sediment wurde je einmal mit 10 % TCA und Äthanol-Äther (3 : 1 Vol.) gewaschen und dann mit 2,4 ml 1 N KOH 18 Stunden bei 30° hydrolysiert. Danach wurde mit 0,8 ml 37 % HCl und 0,6 ml 100 % (w/v) TCA versetzt und nach 1 Stunde Eiskühlung zentrifugiert. Der Überstand mit dem RNA-Hydrolysat wurde zur Ribosebestimmung eingesetzt. Das Sediment wurde mit 2 ml 5 % TCA versetzt und 10 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde zentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung der Desoxyribose eingesetzt.

7.7. Isolierung und Auftrennung von RNA

7.7.1. Fraktionierte RNA-Isolierung nach GEORGIEV et al. (46)

Vor Versuchsbeginn bekamen die Ratten 24 Stunden lang kein Futter. Die Rattenleber wurde in einem Glashomogenisator nach POTTER-ELVEHJEM mit 8 Vol. eiskaltem 0,14M NaCl homogenisiert. Das Homogenat wurde mit der gleichen Menge an wassergesättigtem Phenol (pH 6,0) 15 min bei 4° geschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt (20 min, 1500 g). Die wäßrige Phase wurde abgenommen, das Phenol verworfen und die Zwischenschicht noch 2mal in gleicher Weise extrahiert. Zentrifugiert wurde jetzt 20 min bei 6000 g. Die gesammelten wäßrigen Phasen enthielten die cytoplasmatische oder 4°-RNA.

Die Zwischenschicht wurde dann mit der jeweils 3fachen Menge des eingesetzten Lebergewichtes an Phenol und 0,14M NaCl versetzt und im Wasserbad von 50° 15 min gerührt. Nach Abkühlung in Eis wurden die Phasen wie beschrieben getrennt. Die wäßrige Phase enthielt die 50°-RNA. In gleicher Weise wurde die Zwischenschicht dann bei 65° extrahiert und so die 65°-RNA gewonnen. Alle RNA-Lösungen wurden mit 0,1 Vol. 10 % NaCl und 2 Vol. Äthanol versetzt und die RNA über Nacht bei -18° ausgefällt. Die ausgefallene RNA wurde 2mal mit 5 % TCA und 2mal mit Äthanol-Äther (3 : 1 Vol.) gewaschen, d. h. das Sediment wurde in der Flüssigkeit aufgerührt und dann jeweils bei 6000 g 8 min zentrifugiert.

Die so gereinigte RNA wurde mit 0,3N KOH bei 30° 18 Stunden lang hydrolysiert. Mit 60 % HClO₄ wurde angesäuert, in Eis gekühlt und ausgefallene DNA und KClO₄ durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde mit KOH neutralisiert und

wieder zentrifugiert. 0,1 ml der Lösung wurden mit 10 ml Dioxan-Szintillatorlösung versetzt, um die Radioaktivität zu messen, ein weiterer Teil der Lösung wurde zur Ribosebestimmung eingesetzt.

7.7.2. Gradientenzentrifugation von RNA

Die bei der RNA-Isolierung nach GEORGIEV gewonnenen wäßrigen Phasen (s. 7.7.1.) wurden mit 10 % Natriumlaurylsulfat bis zu einer Konzentration von 0,5 % versetzt. Dann wurde mit dem gleichen Volumen wassergesättigtem Phenol (pH 6,0) 20 min bei 40° geschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt und die RNA ausgefällt wie bei der Isolation beschrieben (7.7.1.). Die ausgefällte RNA wurde in 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) + 1 mM MgCl₂ aufgelöst und durch Zugabe von Kaliumacetat bis zu einer Konzentration von 20 % und 1,5 Vol. Äthanol wieder gefällt. Nach 2 Stunden bei -18° wurde die RNA abzentrifugiert. Der Fällungsprozeß wurde noch einmal wiederholt und die RNA im oben angeführten Tris-Puffer gelöst.

Zur Gradientenzentrifugation wurden 20 - 40 OD₂₆₀-Einheiten dieser RNA eingesetzt. Der Gradient bestand aus 5 - 20 % Saccharose in 10 mM Natriumacetat (pH 5,1) + 0,1 M NaCl + 1 mM MgCl₂. Zentrifugiert wurde 13 Stunden lang mit dem Rotor SW 25.1 in der Spinco Ultrazentrifuge. Die Geschwindigkeit betrug bei der Cytoplasmafraktion 24 000 UpM und bei der 50°-Fraktion 20 000 UpM. Nach dem Zentrifugieren wurden die Röhrchen mit Hilfe eines Abtropfgerätes (99) von unten angestochen und Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen. Je Fraktion wurde 1 ml Wasser zugesetzt und die optische Dichte bei 260 nm gemessen. Für die Radioaktivitätsbestimmung wurden zu jeder Fraktion 0,3 mg Rinderserum-Albumin gegeben, sowie TCA bis zu einer Konzentration von 7 %. Nach 30 min in Eis wurde die RNA auf ein Filter gebracht (Sartorius Membranfilter MF 100), mit 5 % Trichlor-essigsäure gewaschen, 30 min bei 50° getrocknet und dann in Toluol-Szintillatorlösung die Radioaktivität gemessen. In den Abbildungen sind die Zählwerte nach Abzug des Leerwertes angegeben.

7.7.3. Isolierung von tRNA aus Rattenleber nach DANIEL et al. (100)

Rattenleber wurde in eiskalter 0,34 M Saccharose kleingeschnitten, gewaschen und mit 2,3 Vol. 0,34 M Saccharose im Glas-Teflon-Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM homogenisiert (3000 UpM). Diese und alle weiteren Arbeiten wurden bei 4° durchgeführt. Das Homogenat wurde 10 min bei 10 000 g zentrifugiert, der Überstand durch Mull filtriert und nochmals 60 min bei 225 000 g zentrifugiert. Der klare Teil des Überstandes wurde mit einer Pipette entnommen und durch langsame Zugabe von 0,2 N Essigsäure auf pH 5,1 gebracht. Nach 30 min Rühren wurde

zentrifugiert (10 min bei 10 000 g), das Sediment mit 50 mM Kaliumacetat (pH 5,2) gewaschen und dann in 10 mM Tris·HCl (pH 8,5) gelöst, so daß das pH der Lösung 7,4 war. Diese Lösung wurde mit 1 Vol. wassergesättigtem Phenol (frisch destilliert) 15 min geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die wäßrige Phase wurde mit 2 Vol. Äthanol (2 % an Kaliumacetat) versetzt und die RNA über Nacht bei -18° ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Äthanol gewaschen und dann in 50 mM Tris·HCl (pH 7,6) gelöst.

7.7.4. Reinigung von tRNA aus E. coli

E. coli-tRNA wurde von Schwarz BioResearch bzw. von Boehringer Mannheim bezogen und ohne weitere Behandlung im Standardtest eingesetzt. Vor Bestimmung des Methylierungsmaßes wurde sie von verunreinigenden RNAs mit anderem Molekulargewicht befreit. 15 mg tRNA wurden in 0,5 ml 10 mM Kaliumacetat (pH 7,0) gelöst und auf eine Säule mit Sephadex G 75 aufgetragen (1 x 95 cm äquilibriert mit 10 mM Kaliumacetat, pH 7,0). Glasgeräte, Gel und Puffer waren vorher sterilisiert worden, um RNasen zu zerstören. Die RNA wurde bei 4° mit 2,6 ml/Std. eluiert. Die Extinktion des Eluats bei 260 nm wurde registriert. Die Fraktionen des Hauptgipfels enthielten die gereinigte tRNA und wurden gesammelt. Die anderen Fraktionen enthielten keine methylierbare RNA.

7.7.5. Isolierung von ribosomaler RNA aus E. coli nach BOLTON (101)

50 g (feucht) Escherichia coli wurden 3mal gewaschen durch Suspension und Zentrifugieren in TCM (= 10 mM Tris·HCl (pH 7,4) + 10 mM $MgCl_2$). Die Zellpaste wurde dann eingefroren und 4mal durch einen Zellhomogenisator nach EATON (X-Press) gepreßt. Das Homogenat wurde mit 50 ml TCM versetzt und 10 min bei 36 000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals in gleicher Weise mit 50 ml TCM gewaschen, die Überstände zusammengegeben und 45 min bei 145 000 g zentrifugiert. Das Sediment daraus wurde in 80 ml TCM aufgenommen und mit der gleichen Menge an frisch destilliertem Phenol versetzt, das mit 20 mM Phosphat (pH 7,0) + 0,5 % Natriumlaurylsulfat äquilibriert war. Bis hierher wurden alle Arbeiten bei 4° durchgeführt. Jetzt wurde bei Zimmertemperatur 15 min kräftig gerührt und die Phasen dann durch Zentrifugation getrennt. Das Phenol wurde noch 2mal mit je 80 ml TCM in gleicher Weise extrahiert. Die gesammelten wäßrigen Phasen wurden 5mal mit gleichem Volumen Äther ausgeschüttelt und im Wasser gelöster Äther dann durch Einleiten von Stickstoff entfernt. Nach Zusatz von 1/20 Vol. 2M NaCl und 2 Vol. Äthanol wurde die RNA über Nacht bei -18° ausgefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert, in 40 ml 50 mM Tris·HCl (pH 7,6) aufgenommen und ungelöste Substanzen durch Zentri-

fugation abgetrennt (30 min bei 145 000g). Zur Entfernung niedermolekularer RNA wurden 5 ml dieser Lösung (entsprechend 10 mg RNA) auf einer Säule von Sephadex G 200 (2,5 x 40 cm) chromatographiert. Die Extinktion bei 260 nm wurde registriert. Die Fraktionen des ersten Gipfels, d. h. die RNA, die im Ausschlußvolumen wanderte, bildete die gereinigte ribosomale RNA.

7.3. Präparation von Zellfraktionen aus Rattenleber

7.8.1. Herstellung von Homogenatüberstand aus Rattenleber

Bei den Experimenten mit Diäthylnitrosamin bekamen die Tiere (auch die Kontrolltiere) 24 Stunden vor dem Töten kein Futter. Bei späteren Versuchen wurden normal gefütterte Tiere eingesetzt. Der Futterentzug hatte keinen Einfluß auf die Methylasenaktivität.

Die Ratten wurden durch Dekapitation getötet und die Lebern sofort nach Entnahme in eiskalten Homogenisationspuffer getan (0,25 M Saccharose, 10 mM Tris·HCl (pH 7,6), 5 mM Merkaptoäthanol, 1 mM EDTA). Alle folgenden Arbeiten wurden bei 0 - 4° durchgeführt. Die Lebern wurden gewogen, mit einer Schere zerkleinert, mehrmals mit Homogenisationspuffer gewaschen und dann mit 4 Vol. dieses Puffers im Glas-Teflon-Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM homogenisiert (3 000 UpM, 10 - 12 Auf- und Abbewegungen). Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Mull filtriert und dann 20 min bei 27 000 g zentrifugiert. Die Lipidschicht wurde abgesaugt, der Überstand abgegossen und nochmals 60 min bei 105 000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die klare Flüssigkeit zwischen Sediment und restlichen aufgeschwommenen Lipiden entnommen. Dieser Homogenatüberstand wurde direkt zur Reinigung der Methylaser oder, nach Dialyse, zur Bestimmung der Methylasenaktivität bzw. zur Charakterisierung der Methylasen im Homogenatüberstand eingesetzt. Dialysiert wurde 2 Stunden lang gegen 2mal 30 Vol. Extrakt-puffer (10 mM Tris·HCl (pH 7,6), 5 mM Merkaptoäthanol, 1 mM EDTA). Hier und in allen anderen Fällen wurden Dialysesschläuche vor Benutzung in 10 mM EDTA (pH 8,0) aufgekocht und anschließend mit Wasser gespült.

7.8.2. Isolierung von Zellkernen und Cytoplasma nach SIMON et al. (36)

4 g Leber wurden mit 36 ml 0,25 M Saccharose (mit 10 mM Tris·HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 5 mM Merkaptoäthanol) homogenisiert (s. 7.8.1.). Das Homogenat wurde 10 min bei 1 000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde 3mal im Homogenisationspuffer gewaschen und bildete die Kernfraktion. Der Überstand wurde 20 min bei 20 000 g zentrifugiert und dann, nach Abtrennen von Sediment und Lipiden, nochmals 60 min bei 105 000 g zentrifugiert.

giert. Der klare Überstand der letzten Zentrifugation wurde 2 Stunden lang gegen Extraktpuffer (10 mM Tris·HCl (pH 7,6), 5 mM Merkaptoäthanol, 1 mM EDTA) dialysiert und bildete die Cytoplasmafraktion.

7.8.3. Isolierung von Zellkernen nach BLOBEL et al. (72)

1,5 g Leber wurden in 3 ml 0,25 M Saccharose (mit 50 mM Tris·HCl (pH 7,5), 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Merkaptoäthanol) homogenisiert (s. 7.8.1.). Je 1 ml Homogenat wurde mit 2 ml 2,3 M Saccharose gemischt und im Zentrifugenröhrchen mit 1 ml 2,3 M Saccharose unterschichtet. 2,3 M Saccharose enthielt die gleichen Zusätze wie der Homogenisationspuffer. Nach 30 min Zentrifugation bei 170 000 g wurde der Überstand abgegossen und die Reste der Saccharoselösung sorgfältig ausgewischt. Das Sediment bestand aus Zellkernen.

7.8.4. Isolierung von Zellkernen nach MURAMATSU et al. (50)

4 g Leber wurden in 0,25 M Saccharose (mit 10 mM Tris·HCl (pH 7,6), 3,3 mM CaCl₂, 5 mM Merkaptoäthanol) zerkleinert und gewaschen. Dann wurde mit 40 ml 2,4 M Saccharose (Zusätze wie oben) homogenisiert (s. 7.8.1.). Das Homogenat wurde 60 min bei 40 000 g zentrifugiert. Das Sediment bildete die Kernfraktion.

7.8.5. Nichtwäßrige Isolierung von Zellkernen nach SIEBERT (73)

Rattenlebern wurden sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorenen Stücke wurden in einem Porzellanmörser unter flüssigem Stickstoff möglichst weitgehend zerkleinert und in etwa zwei Tagen gefriergetrocknet. Alle weiteren Arbeiten wurden bei 4° durchgeführt. Das grobe Pulver wurde im Mixer bei voller Geschwindigkeit fein pulverisiert und durch das Prüfsieb 0,40 (mit Nylongewebe) gesiebt.

Je 100g Pulver wurden dann mit 450 ml Petroläther (Kp 50 - 75°) und 600 g Porzellankugeln (15 - 20 mm Durchmesser) in der Kugelmühle mit 60 - 80 UpM 1 1/2 - 3 Tage lang gemahlen. Alternativ wurde in einer 5 l Glasflasche mit 700 g Glasperlen (4 mm Durchmesser) bei gleicher Frequenz geschüttelt. Die Freisetzung von Zellkernen wurde mikroskopisch verfolgt. Hier und bei den späteren Kontrollen wurden Abstriche mit 0,1 % wäßriger Kristallviolett-Lösung angefärbt.

Nach dem Mahlen wurde durch Gaze filtriert, um Porzellan- bzw. Glaskugeln zu entfernen. Der Petroläther wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Das Lebermaterial wurde dann in Cyclohexan-Tetrachlormethan-Mischung steigender Dichte zentrifugiert und so spezifisch leichteres Zellmaterial schrittweise abgetrennt.

Es wurde 3mal bei Dichte 1,200 (20 min, 900 g), 2mal bei Dichte 1,315 (60 min, 2 000 g) und 2mal bei Dichte 1,330 (80 min, 2 000 g) zentrifugiert. Das Sediment wurde vor jeder Zentrifugation sorgfältig in neuem Lösungsmittel suspendiert. Ab Dichte 1,315 wurden die Überstände ein zweites Mal zentrifugiert und das zusätzliche Sediment weiterverarbeitet wie die Hauptmenge. Nicht mehr gebrauchte Überstände wurden gesammelt und durch ein Faltenfilter filtriert. Der Filtrationsrückstand bildete, nach Waschen mit Petroläther und Trocknen, die Cytoplasmafraktion.

Das Sediment der letzten Zentrifugation wurde bei einer Dichte von 1,370 zentrifugiert. Dabei schwammen die Zellkerne auf. Der Überstand mit den Zellkernen wurde wieder verdünnt und die Kerne noch mehrmals bei Dichten zwischen 1,330 und 1,340 sedimentiert, bis im Mikroskop keine weitere Reinigung mehr feststellbar war. Die Zellkerne wurden dann 2mal mit Petroläther gewaschen, im Vakuum über CaCl_2 und Paraffinspänen getrocknet und bei -18° über Silicagel aufbewahrt. Zweieinhalb Jahre nach der Präparation hatten die Zellkerne höchstens 50 % der Methy-lasenaktivität verloren.

7.8.6. Extraktion von wäßrigen Zellkernen und nichtwäßrigen Präparationen

Zur Extraktion von Methy-lasen wurden die nichtwäßrigen Präparationen und die aus wäßrigen Homogenaten gewonnenen Zellkerne mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators (Branson Sonifier) in Extrakt-puffer suspendiert (10 mM Tris·HCl (pH 7,6), 5 mM Merkaptoäthanol, 1 mM EDTA). Die Suspensionen wurden dann 30 min bei 140 000 g zentrifugiert, die Überstände 2 Stunden lang gegen 100 Vol. Extrakt-puffer dialysiert und dann im Methy-lasentest eingesetzt. Die Sedimente enthielten keine Methy-lasenaktivität. Statt des Ultraschallapparates konnte ein Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM zum Suspendieren benutzt werden.

7.9. Bestimmung der Methy-lasenaktivität

7.9.1. Standardtest

Wenn nicht anders angegeben, enthielt der Inkubationsansatz: 17 μM ^3H -SAM (50 - 100 Ci/Mol); 0,5 mM Dithioerythrit; 300 mM Kaliumacetat; 110 mM Tris·HCl; 50 μg tRNA von E.coli und verschiedene Mengen Enzymprotein in einem Volumen von 0,3 ml. Das pH war 8,5. Nach 60 min Inkubation bei 37° wurden die Gläser in Eis gestellt und dadurch die Reaktion abgebrochen. Zu jedem Ansatz wurden 0,05 ml 1 % Hefe-RNA, 0,1 ml 10 % NaCl, 0,1 ml 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und 3,5 ml 0,1 % CTAB gegeben. Nach 1 Stunde bei 0° wurde zentrifugiert (7 min bei 6 000 g). Das Sediment wurde mit 0,5 ml 10 % NaCl gelöst und mit 0,2 ml 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und

7 ml 0,1 % CTAB wieder gefällt. Nach weiteren 2 Stunden bei 0° wurde die Suspension durch ein Glasfaserfilter (Whatman GF/A, 25 mm) filtriert und mit etwa 20 ml 2 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ nachgewaschen. Die Filter wurden 30 min bei 80° getrocknet und nach der Methode von TREWAVAS (102) im Zählgefäß mit 1 ml Methoxyäthanol aufgekocht. Nach Abkühlung wurden 10 ml Toluol-Szintillatorlösung zugesetzt und die eingebaute Radioaktivität gemessen. Jeder Wert wurde als Mittel von zwei Ansätzen bestimmt. Blindwerte ergaben sich aus Ansätzen, die ohne RNA inkubiert wurden. Eine Enzymeinheit ist die Menge Enzym, die unter diesen Bedingungen den Einbau von 1 n Mol Methylgruppen in RNA katalysierte.

7.9.2. Kurztest

Nach säulenchromatographischer Auftrennung der Methylasen wurde die Aktivität in den Eluatfraktionen mit einem vereinfachten Test bestimmt. Die Ansätze enthielten nur 1,7 μM ^3H -SAM und 10 μg RNA. Inkubiert wurde nur 30 min lang und 30 min nach der ersten Ausfällung wurde filtriert und die Radioaktivität bestimmt.

Durch Reduktion der SAM-Konzentration und der Inkubationszeit ergaben sich 4fach geringere Zählwerte, jedoch erlaubte dieses verkürzte Verfahren eine Weiterverarbeitung der aktiven Fraktionen noch am selben Tag.

7.10. Basen- und Nucleotidanalyse

7.10.1. Basenanalyse nach Methylmarkierung in vivo

Von der nach GEORGIEV isolierten RNA (s. 7.7.1.) wurden 40 OD₂₆₀-Einheiten in einem kleinen Reagenzglas unter Stickstoff eingetrocknet, mit 0,15 ml 70 % HClO_4 versetzt und das mit einem Schliffstopfen verschlossene Glas 1 Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 0,15 ml Wasser zugefügt, mit KOH neutralisiert und 10 min bei 5 000 g zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde auf Whatman-Papier Nr. 1 aufgetragen und 24 Stunden lang absteigend chromatographiert mit dem Fließmittel Propanol(2) - 37 % HCl - H_2O (65 : 17 : 18). Die einzelnen Basen wurden im UV-Licht lokalisiert, die Flecken ausgeschnitten und direkt in Toluol-Szintillatorlösung gegeben zur Messung der Radioaktivität.

7.10.2. Nucleotidanalyse nach Methylmarkierung in vivo (103)

Von der nach GEORGIEV isolierten RNA (s. 7.7.1.) wurden nach alkalischer Hydrolyse und Neutralisation etwa 2 OD₂₆₀-Einheiten

auf Dünnschichtplatten aufgetragen (Cellulosepulver MN 300 HR von Macherey & Nagel). Die Platten wurden mit 50 mM Natriumformiat, pH 3,4, besprüht und mit 100 V/cm bei -40° eine Elektrophorese durchgeführt. Dann wurde mit dem Fön getrocknet und in der 2. Dimension chromatographiert mit dem Fließmittel ges. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1 M Natriumacetat - Propanol(2) (80 : 18 : 2). Die Flecken wurden unter dem UV-Licht lokalisiert, ausgekratzt und in Dioxan-Szintillatorlösung gegeben zur Messung der Radioaktivität.

7.10.3. Basenanalyse nach Methylmarkierung in vitro

Um genügend Material für die Basenanalyse zu bekommen, wurde ein 3facher Standardansatz inkubiert. Die Reaktion wurde nach einer Stunde, bei den Carcinogenese-Experimenten nach 2 Stunden abgebrochen. Die RNA wurde gefällt und umgefällt, wie beim Standardtest beschrieben, jedoch wurde keine Träger-RNA und bei der ersten Fällung auch kein NaCl zugesetzt. Nach der zweiten Fällung wurde wieder zentrifugiert, der Niederschlag in 0,1 ml 10 % NaCl aufgenommen, vom Ungelösten abzentrifugiert und mit 0,3 ml 7 % TCA gefällt. Der Niederschlag wurde mit Äthanol-Äther (3 : 1 Vol.) gewaschen, im Luftstrom getrocknet und mit 0,05 ml 70 % HClO_4 eine Stunde lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Wurde viel Protein im Test eingesetzt, war die RNA-Ausbeute besser, wenn nach der ersten Fällung mit Phenol extrahiert wurde.

Das Hydrolysat wurde in Eis gekühlt, 5 Vol. Äthanol zugesetzt und gesättigte KHCO_3 -Lösung zugefügt, bis die Lösung gerade noch sauer reagierte. Nach 2 Stunden bei -18° wurde das ausgefallene Perchlorat durch Zentrifugation entfernt und die Lösung im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,01 ml 1 M HCl in Äthanol aufgenommen und ein Teil davon zusammen mit Vergleichsbasen auf eine Cellulose-Dünnschichtplatte aufgetragen (Macherey & Nagel CEL 300, 20 x 20 cm).

Chromatographiert wurde in der ersten Dimension mit

- A) Methanol - 37 % HCl - H_2O (65 : 17 : 18 Vol.) und in der zweiten Dimension mit
- B) Butanol(1) - Eisessig - H_2O (4 : 1 : 1 Vol.) oder
- C) ges. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,1 M Phosphat (pH 6,0) - Propanol(2) (79 : 19 : 2 Vol.) oder
- D) Butanol(1) - H_2O - conc. NH_3 (85 : 14 : 1 Vol.)

Zur Rechromatographie wurde das RNA-Hydrolysat zusammen mit Vergleichsbasen in den Fließmitteln A und B aufgetrennt, die Flecken mit 0,1N HCl eluiert, eingengt und mit Fließmittel C rechromatographiert. Die Flecken wurden unter UV-Licht lokalisiert, die Cellulose abgekratzt, 30 sec mit 1 ml Methoxyäthanol aufgeköcht und 10 ml Toluol-Szintillatorlösung zugesetzt. Die Flüssigkeit wurde abgegossen und die Extraktion wiederholt. Die Flüssigkeiten wurden zusammengegeben und die Radioaktivität gemessen.

7.10.4. Basenauftrennung mit Dowex-Ionenaustauscher nach CRADDOCK (56)

Dowex 50 WX8 wurde mit 0,1 N NaOH und 2 N HCl gewaschen, von feinen Partikeln befreit, in eine Säule (0,9 x 14 cm) gepackt und mit 1 N HCl äquilibriert. Das neutralisierte HClO₄-Hydrolysat von etwa 0,2 mg in vitro methylierter RNA wurde zusammen mit einer Mischung der vier Hauptbasen aufgetragen. Mit 80 ml 1 N HCl und anschließendem Gradienten von 500 ml 1 - 4 N HCl wurde eluiert (100 ml/Std.) und Fraktionen zu 4 ml aufgefangen. In den Fraktionen wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen und jeweils 1 ml eingedampft, der Rückstand mit 1 ml Methoxyäthanol aufgeköcht und nach Zusatz von 10 ml Toluol-Szintillatorlösung die Radioaktivität gemessen. Die Fraktionen jeweils eines Radioaktivitätsgipfels wurden zusammengegeben, und mit Dünnschichtchromatographie wurde bestimmt, um welche Methylbase es sich handelte. Das Elutionsdiagramm stimmte mit dem von CRADDOCK beschriebenen überein.

7.10.5. Prüfung auf Vollständigkeit der HClO₄-Hydrolyse

Auf die Mitte einer Cellulose-Dünnschichtplatte wurde das Perchlorsäure-Hydrolysat von in vitro methylierter RNA aufgetragen. Daneben wurden als Vergleichssubstanzen Mischungen von Nucleosiden und von 2',3'-Nucleotiden aufgetragen. Die Platte wurde mit 50 mM Natriumboratlösung (pH 9,5) besprüht und mit 40 - 50 V/cm bei 0° elektrophoriert. Unter diesen Bedingungen wandern Nucleoside und, stärker noch, Nucleotide zur Anode, Basen jedoch zur Kathode.

7.10.6. Prüfung der Stabilität von 1-Methyladenin und 5-Methylcytosin

Lösungen mit etwa 30 µg 1mA bzw. 5mC wurden eingedampft, der Rückstand mit 0,03 ml 70 % HClO₄ eine Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend mit Wasser auf 3 ml verdünnt. Als Kontrollen wurden genau gleiche Mengen an Lösung eingeengt, mit HClO₄ versetzt und ohne Erhitzen sofort verdünnt. Im registrierenden Spektralphotometer (Zeiss RP. 20A) wurden die UV-Spektren aller Proben aufgenommen.

7.11. Nucleasenbehandlung

Jeweils 10 OD₂₆₀-Einheiten RNA wurden in 0,4 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) + 1 mM MgCl₂ mit 50 µg RNase bzw. DNase 30 min lang bei 37° inkubiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen 10 % TCA zugegeben und in Eis gekühlt. Der Ansatz wurde dann auf Sartorius Membranfilter (MF 100, 25 mm) gegeben, mit 4 % TCA gewaschen und dann getrocknet. Die Filter wurden in Toluol-

Szintillatorlösung gegeben und die Radioaktivität gemessen.

7.12. Prüfung auf Ribosemethylierung

Die RNA wurde mit HClO_4 hydrolysiert wie unter 7.10.1 beschrieben. Nach Neutralisation und Zentrifugieren wurden 0,01 ml des Überstandes in Dioxan-Szintillatorlösung gegeben und die Radioaktivität gemessen. Die Differenz zwischen der eingesetzten und der im Überstand wiedergefundenen Radioaktivität entspricht der Ribosemethylierung.

7.13. Elektrophoretische Reinigung von S-Adenosyl-L-Methionin nach HURWITZ (15)

Whatman-Papier 3 MM wurde mit 50 mM Ammoniumformiat (pH 3,5) angefeuchtet und 0,1 μmol ^3H -SAM strichförmig aufgetragen. Mit einer Spannung von 25 Volt/cm wurde auf einer gekühlten Platte 40 min elektrophoriert. Das Papier wurde dann im kalten Luftstrom getrocknet, die Banden unter dem UV-Licht lokalisiert und bei 4° mit 20 mM HCl eluiert. Das Eluat der stärksten Bande (die das SAM enthielt) wurde lyophilisiert und der Rückstand mit 100 μl 20 mM HCl aufgenommen.

7.14. Carcinogenese mit Diäthylnitrosamin (DENA)

Den Ratten wurde täglich 4 mg DENA/kg im Trinkwasser verabreicht. 4 mg des Carcinogens wurden zuerst in 100 ml, später in 75 ml gelöst. Die Tiere wogen zu Beginn des Versuchs 200 g und waren etwa 4 Monate alt. Als Kontrolltiere dienten gleichalte Ratten, die während der Versuchszeit reines Trinkwasser bekamen.

7.15. Gelchromatographie der Methylasen nach BAGULEY et al. (23)

30 mg Kernpulver wurden mit 3 ml Extraktpuffer extrahiert (s. 7.8.6.). 1 ml Extrakt wurde auf eine Säule mit Sephadex G 200 (1 x 95 cm, äquilibriert mit Extraktpuffer) aufgetragen und mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/Std. bei 4° eluiert. Fraktionen zu 2 ml wurden aufgefangen und ein Teil jeder Fraktion im Standardtest auf Methylasenaktivität eingesetzt. Die Fraktionen, die Aktivität enthielten, wurden in drei Gruppen zusammengefaßt und über Nacht gegen 3 Vol. gesättigter Ammoniumsulfatlösung dialysiert. Die entstandenen Niederschläge wurden abzentrifugiert, in Extraktpuffer aufgenommen und Anteile der Lösungen in 4fachen Standardtests eingesetzt zur Bestimmung der Reaktionsprodukte der Methylasen.

7.16. Gradientenzentrifugation der Cytosin-5-Methylase

20 µg Alkoholdehydrogenase und 20 oder 100 µg Protein der Cytosin-5-Methylasenpräparation, alle in Extrakt-puffer (10 mM Tris·HCl (pH 7,6); 5 mM Merkaptoäthanol; 1 mM EDTA), wurden gemischt, mit Extrakt-puffer auf 0,1 ml aufgefüllt und auf 5 ml eines Saccharosegradienten (5 - 20 %, in Extrakt-puffer) aufgetragen. Zentrifugiert wurde 14 Stunden lang mit dem Rotor SW 65 Ti in der Spinco Ultrazentrifuge. Die Geschwindigkeit betrug 50 000 UpM (250 000 g), die Temperatur 2°. Nach dem Zentrifugieren wurden die Becher mit Hilfe eines Abtropfgerätes (99) von unten angestochen und Fraktionen von abwechselnd ein und zwei Tropfen aufgefangen. Die Fraktionen zu einem Tropfen wurden mit 0,2 ml Wasser versetzt und zur Bestimmung der Alkoholdehydrogenase benutzt. Die Fraktionen zu zwei Tropfen wurden direkt im Kurztest auf Methylasenaktivität eingesetzt.

7.17. Bestimmung der Alkoholdehydrogenase

In eine Küvette wurden pipettiert: 0,1 ml Probe; 0,1 ml Äthanol; 0,2 ml 2 % NAD und 2 ml einer Mischung von 1 Vol. 0,1 % Semicarbazidhydrochlorid mit 20 Vol. 0,1 M Tris·HCl (pH 8,8). Im registrierenden Photometer wurde die Extinktionszunahme bei 366 nm verfolgt. Als willkürliches Maß für die Enzymaktivität wurde der lineare Extinktionsanstieg in 5 min genommen.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Inhalt der vorliegenden Arbeit sind a) Untersuchungen in vivo zum Ort und Verlauf der RNA-Methylierung und b) Charakterisierung der Methylasen der Transfer-RNA.

Zunächst wurden die Orte der RNA-Methylierung in der normalen Säugetierzelle bestimmt. Dazu wurde Ratten radioaktiv markiertes Methionin injiziert und zu verschiedenen Zeiten danach die Leber-RNA in Fraktionen isoliert und durch Gradientenzentrifugation weiter aufgetrennt. Es wurde gefunden, daß die beiden ribosomalen RNAs an ihrer gemeinsamen, im Zellkern gebundenen Vorstufe (45s) methyliert werden, während die Methylierung der Transfer-RNA im löslichen Zellraum (Cytoplasma bzw. Nucleoplasma) erfolgt.

Da einige Autoren eine Beteiligung veränderter Methylasen an der Krebsentstehung für möglich halten, wurde in der Frühphase der Carcinogenese nach Veränderungen der RNA-Methylierung gesucht. Dazu wurde den Ratten das Carcinogen Diäthylnitrosamin gegeben und die oben beschriebenen Versuche wiederholt. Bei keiner RNA wurde eine erhöhte Methylierung gefunden. Ein verringerter Methyleinbau in Vorstufen der ribosomalen RNA konnte mit verringerter RNA-Synthese erklärt werden.

Ebenfalls in der frühen Carcinogenese, aber auch im manifesten Tumor, wurden die Methylasen der Transfer-RNA untersucht. Ihre Aktivität war im Frühstadium unverändert, im Tumor jedoch um 60 % erhöht. Durch Analyse der in vitro gebildeten Methylbasen wurde die relative Aktivität einzelner Methylasen bestimmt. Lebern von Kontrolltieren, Tumortieren und Tieren in der Carci-

nogenese hatten die gleiche Aktivitätsverteilung. Methylasen aus Tumoren konnten Transfer-RNA aus normaler Rattenleber nicht methylieren. Die vorliegenden Experimente gaben also keinen Hinweis auf eine Beteiligung der Methylasen an der Krebsentstehung.

Die Experimente in vivo ließen offen, ob Transfer-RNA im Cytoplasma oder im Nucleoplasma methyliert wird. Darum wurde versucht, den Ort der Methylasen der Transfer-RNA zu bestimmen. Es wurden Zellkerne nach einem nichtwäßrigen Verfahren isoliert, bei dem Diffusion oder "Herauslecken" von Enzymen aus dem Kern ausgeschlossen ist. Die so gewonnenen Zellkerne enthielten eine viel höhere Methylasenaktivität als die auf gleichem Wege hergestellte Cytoplasmafraktion. In allen Fraktionen war die Methylasenaktivität proportional dem DNA-Gehalt. Die Kernmethylasen hatten die gleichen Eigenschaften wie die früher in wäßrigen Cytoplasmapräparationen gefundenen Methylasen. Entgegen früheren Befunden anderer Autoren wird angenommen, daß die Methylasen der Transfer-RNA überwiegend im Zellkern lokalisiert sind.

Die Methylasen wurden enzymologisch weiter charakterisiert. Der Einfluß der Substratkonzentration, der Art des Substrates, des pH und verschiedener Metallionen wurde untersucht. Je nach Art der eingesetzten Transfer-RNA waren die einzelnen Methylasen unterschiedlich aktiv. Sie waren empfindlich gegen einige Metallionen (Zn^{++} , Cd^{++}) und wurden beim Verdünnen reversibel inaktiviert. Unter Testbedingungen und bei Aufbewahrung in Eis waren die Methylasen über Stunden bzw. Tage stabil. Es wurde versucht, das Ausmaß zu bestimmen, bis zu dem die Methylasen eine gegebene RNA-Menge methylieren können. Es zeigte sich,

daß diese Bestimmung mit ungereinigten Methylasen nicht sinnvoll ist.

Die Cytosin-5-Methylase wurde von den anderen Methylasen abgetrennt. Durch Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie auf Cellulose-Ionenaustauscher und Sephadex-Gel wurde eine Enzympräparation erhalten, die nur noch 5 - 10 % fremder Methylasenaktivität enthielt. Problem der Reinigung war die große Empfindlichkeit der Methylasen. Darum betrug die Ausbeute nur wenige Prozent und die Gesamtanreicherung war nur 20 - 50fach.

Auch die angereicherte Cytosin-5-Methylase wurde durch Verdünnen reversibel inaktiviert. Aus der Sedimentationsgeschwindigkeit des Enzyms bei verschiedenen Proteinkonzentrationen ergab sich, daß die Verdünnungsinaktivierung auf einem reversiblen Zerfall des Enzyms in inaktive Untereinheiten beruht. Die Reinheit des Enzyms reichte aus, um an unfractionierter Transfer-RNA von *E. coli* das Methylierungsausmaß zu bestimmen. Danach wurde im Durchschnitt jedes RNA-Molekül einmal methyliert. Die Aktivität der Cytosin-5-Methylase gegen verschiedene spezifische Transfer-RNAs wurde gemessen. Die Ergebnisse ließen sich erklären mit der Vorstellung, daß eine Position zwischen TΨC- und Extra-Arm methyliert wird.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) R.H. BURDON, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 11, 33 (1971)
- 2) R.H. BURDON, A.E. CLASON, J. Mol. Biol. 39, 113 (1969)
- 3) S. ALTMAN, Nature (New Biol.) 229, 19 (1971)
- 4) R. WILLIAMSON, C.E. DREWINKIEWICZ, J. PAUL, Nature (New Biol.) 241, 66 (1973)
- 5) R.A. WEINBERG, S. PENMAN, J. Mol. Biol. 47, 169 (1970)
- 6) B.E.H. MADEN, Nature 219, 685 (1968)
- 7) Y. HAYASHI, S. OSAWA, K. MIURA, Biochim. Biophys. Acta 129, 519 (1966)
- 8) K. RANDEKATH, Cancer Res. 31, 658 (1971)
- 9) L.A. ISAKSSON, J.H. PHILLIPS, Biochim. Biophys. Acta 155, 63 (1968)
- 10) Y. IWANAMI, G.M. BROWN, Arch. Biochem. Biophys. 126, 8 (1968)
- 11) G.M. BROWN, G. ATTARDI, Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 298 (1965)
- 12) J.S. STARR, B.H. SELLS, Physiol. Rev. 49, 623 (1969)
- 13) E. FLEISSNER, E. BOREK, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48, 1199 (1962)
- 14) E. BOREK, P.R. SRINIVASAN in S.K. Shapiro und F. Schlenk: Transmethylation and Methionine Biosynthesis, The University of Chicago Press, Chicago, S. 115 (1965)
- 15) H. HURWITZ, M. GOLD, M. ANDERS, J. Biol. Chem. 239, 3462 (1964)
- 16) J. HURWITZ, M. ANDERS, M. GOLD, J. SMITH, J. Biol. Chem. 240, 1256 (1965)
- 17) G.R. BJÖRK, I. SVENSSON, Eur. J. Biochem. 9, 207 (1969)
- 18) Y. KUCHINO, S. NISHIMURA, Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 306 (1970)
- 19) B.C. BAGULEY, W. WEHRLI, M. STAEHELIN, Biochemistry 9, 1645 (1970)
- 20) Y. KUCHINO, T. SENO, S. NISHIMURA, Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 476 (1971)
- 21) L.P. SHERSNEVA, T.V. VENKSTERN, A.A. BAYEV, FEBS Letters 14, 297 (1971)

- 22) P.R. SRINIVASAN, E. BOREK, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 5, 157 (1966)
- 23) B.C. BAGULEY, M. STAEHELIN, *Eur. J. Biochem.* 6, 1 (1968)
- 24) R. RODEH, M. FELDMAN, U.Z. LITTAUER, *Biochemistry* 6, 451 (1967)
- 25) R.A. WEINBERG, U. LOENING, M. WILLEMS, S. PENMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58, 1088 (1967)
- 26) G.R. BJÖRK, L.A. ISAKSSON, *J. Mol. Biol.* 51, 83 (1970)
- 27) T.L. HELSER, J.E. DAVIES, J.E. DAHLBERG, *Nature (New Biol.)* 233, 12 (1971)
- 28) R. STERN, F. GONANO, E. FLEISSNER, U.Z. LITTAUEF, *Biochemistry* 2, 10 (1970)
- 29) J.B. MARMOR, H.W. DICKERMAN, A. PETERKOFSKI, *J. Biol. Chem.* 246, 3464 (1971)
- 30) M.P. STULBERG, L.R. SHUGART, *Cancer Res.* 31, 671 (1971)
- 31) G.R. BJÖRK, F.C. NEIDHARDT, *Cancer Res.* 31, 706 (1971)
- 32) M.L. GEFTER, R.L. RUSSEL, *J. Mol. Biol.* 39, 145 (1969)
- 33) D. PILLINGER, E. BOREK, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62 1145 (1969)
- 34) B.S. BALIGA, P.R. SRINIVASAN, E. BOREK, *Nature* 208, 555 (1965)
- 35) O.K. SHARMA, S.J. KERR, R. LIPSHITZ-WIESNER, E. BOREK, *Fed. Proc.* 30, 167 (1971)
- 36) L.N. SIMON, A.J. GLASKY, T.H. REJAL, *Biochim. Biophys. Acta* 142, 99 (1967)
- 37) R.L. HANCOCK, P. MCFARLAND, R.R. FOX, *Experientia* 23, 806 (1967)
- 38) R.W. TURKINGTON, *J. Biol. Chem.* 244, 5140 (1969)
- 39) R.W. TURKINGTON, H. RIDDLE, *Cancer Res.* 30, 650 (1970)
- 40) P.L. BERGQUIST, R.E.E. MATTHEWS, *Biochem. J.* 85, 305 (1962)
- 41) G.L. VIALE, A. FONDELLI RESTELLI, E. VIALE, *Tumori* 53, 533 (1967)
- 42) E. TSUTSUI, P.R. SRINIVASAN, E. BOREK, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 56, 1003 (1966)
- 43) P.N. MAGEE, *Cancer Res.* 31, 599 (1971)
- 44) R.H. BURDON, *Nature* 210, 797 (1966)
- 45) H. GREENBERG, S. PENMAN, *J. Mol. Biol.* 21, 527 (1966)

- 46) G.P. GEORGIEV, O.P. SAMARINA, M.I. LERMAN, M.N. SMIRNOV, A.N. SERVERTZOV, *Nature* 200, 1291 (1963)
- 47) G.P. GEORGIEV, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 6, 259 (1967)
- 48) A.G. SAPONARA, M.D. ENGER, *Biochim. Biophys. Acta* 119, 492 (1966)
- 49) E.F. ZIMMERMAN, B.W. HOLLER, *J. Mol. Biol.* 23, 149 (1967)
- 50) M. MURAMATSU, T. FUJISAWA, *Biochim. Biophys. Acta* 157, 476 (1968)
- 51) R.H. BURDON, B.T. MARTIN, B.M. LAL, *J. Mol. Biol.* 28, 357 (1967)
- 52) H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, S. IVANCOVIC, D. SCHMÄHL, *Z. Krebsforsch.* 69, 103 (1967)
- 53) F. BÜCHNER, E. GRUNDMANN, W. OEHLERT, *Dtsch. Med. Wochenschr.* 86, 1845 (1961)
- 54) E. GRUNDMANN, H. SIEBURG, *Beitr. Pathol.* 126, 57 (1962)
- 55) P.N. MAGEE, J.M. BARNES, *Adv. Cancer Res.* 10, 163 (1967)
- 56) V.M. CRADDOCK, *Biochim. Biophys. Acta* 195, 351 (1969)
- 57) Y. IWANAMI, G.M. BROWN, *Arch. Biochem. Biophys.* 124, 472 (1968)
- 58) A. MITTELMAN, R.H. HALL, D.S. YOHAN, J.T. GRACE jr., *Cancer Res.* 27, 1409 (1967)
- 59) M.I. STEWART, M.H. CORRANCE, *Cancer Res.* 29, 1642 (1969)
- 60) G.L. VIALE, *Cancer Res.* 31, 605 (1971)
- 61) V.M. CRADDOCK, *Biochem. J.* 124, 44 p (1971)
- 62) B. SHEID, S.M. WILSON, H.P. MORRIS, *Cancer Res.* 31, 774 (1971)
- 63) B. HACKER, L.R. MANDEL, *Biochim. Biophys. Acta* 190, 38 (1969)
- 64) T.P. WAALKES, R.H. ADAMSON, R.W. O'GARA, R.C. GALLO, *Arch. Int. Pharmacodyn.* 191, 189 (1971)
- 65) A.M. KAYE, P.S. LEBOY, *Biochim. Biophys. Acta* 157, 289 (1968)
- 66) S.J. KERR, *Biochemistry* 9, 690 (1970)
- 67) S.Q. CHANEY, B.C. HALPERN, R.M. HALPERN, R.A. SMITH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 1209 (1970)
- 68) P.S. LEBOY, *Biochemistry* 9, 1577 (1970)
- 69) P.S. LEBOY, *FEBS Letters* 16, 117 (1971)

- 70) A.H. MEHLER, K. CHAKRABURTTY, Adv. Enzymol. 35, 443 (1971)
- 71) B.C. BAGULEY, M. STAEHELIN, Biochemistry 7, 45 (1968)
- 72) G. BLOBEL, V.R. POTTER, Science 154, 1662 (1966)
- 73) G. SIEBERT in H.M. Rauen, Biochemisches Taschenbuch, Bd. 2, Springer Verlag, Berlin, 2. Auflg., 1964, S. 541
- 74) G. SIEBERT, G.B. HUMPHREY, Adv. Enzymol. 27, 239 (1965)
- 75) M.L. BIRNSTIEL, E. FLEISSNER, E. BOREK, Science 142, 1577 (1963)
- 76) J.L. SIRLIN, J. JACOB, C.J. TANDLER, Biochem. J. 89, 447 (1963)
- 77) M. BUSCH, Methods Enzymol. 12 A 427 (1967)
- 78) G.P. GEORGIEV in D.B. Roodyn: Enzyme Cytology, Academic Press, New York (1967) S. 27
- 79) L.A. CULP, G.M. BROWN, Arch. Biochem. Biophys. 124, 483 (1968)
- 80) A.E. PEGG, Biochim. Biophys. Acta 232, 630 (1971)
- 81) M. DIXON, E.C. WEBB: Enzymes; Longmans, Green and Co; London, New York (1958) Toronto
- 82) M. STAEHELIN, Experientia 27, 1 (1971)
- 83) B.C. BAGULEY, M. STAEHELIN, Biochemistry 8, 257 (1969)
- 84) A.E. PEGG, Biochim. Biophys. Acta 262, 283 (1972)
- 85) H.K. SCHACHMAN: Ultracentrifugation in Biochemistry; Academic Press; New York, London (1959)
- 86) R.G. MARTIN, B.N. AMES, J. Biol. Chem. 236, 1372 (1961)
- 87) M. SIMSEK, UL. RAJ BHANDARY, Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 508 (1972)
- 88) L.P. SHERSHNEVA, T.V. VENKSTERN, A.A. BAYEV, Biochim. Biophys. Acta 294, 250 (1973)
- 89) A.E. PEGG, FEBS Letters 16, 13 (1971)
- 90) E. WAINFAN, E. BOREK, Mol. Pharmakol. 3, 595 (1967)
- 91) S.J. KERR, J. Biol. Chem. 247, 4248 (1972)
- 92) H.J. GROSS, D. WILDENAUER, Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 58 (1972)
- 93) F.J. REITHEL, Adv. Protein Chem. 18, 123 (1963)
- 94) W. ARBER, S. LINN, Ann. Rev. Biochem. 38, 447 (1969)
- 95) O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.L. RANDALL, J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- 96) W. MEJBAUM, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 258, 117 (1939)

- 97) Z. DISCHE, Mikrochemie 8, 4 (1930)
- 98) G. SCHMIDT, S.J. THANNHAUSER, J. Biol. Chem. 161, 83 (1945)
- 99) W. HIBY, H. KRÖGER, H. GRAFMÜLLER, Naturwissenschaften 52, 591 (1965)
- 100) V. DANIEL, U.Z. LITTAUER, J. Biol. Chem. 238, 2102 (1963)
- 101) E.T. BOLTON in G.L. CANTONI und D.R. DAVIES: Procedures in Nucleic Acid Research, Harper and Row, New York, and Weather Hill, Tokyo, (1967) S. 437
- 102) A. TREWAVAS, Anal. Biochem. 16, 264 (1966)
- 103) W. HIBY, H. KRÖGER, J. Chromatogr. 26, 545 (1967)

L e b e n s l a u f

Am 31. 10. 1941 wurde ich in Leer/Ostfriesland geboren als Sohn von August-Wilhelm Kahle und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Sevecke, beide Apotheker.

In Leer und, nach einem Umzug 1953, in Bremerhaven besuchte ich Grund- und Oberschule bis zum Abitur am Wilhelm Raabe-Gymnasium, Bremerhaven, im April 1961. Die Schulzeit wurde 1959 - 60 unterbrochen durch einen einjährigen Aufenthalt in den USA als Austauschschüler.

Von 1961 bis zum pharmazeutischen Vorexamen 1963 arbeitete ich als Apothekerpraktikant in der Apotheke am Hauptbahnhof, Bremerhaven. Ab Sommersemester 1963 studierte ich an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br., zunächst ein Semester Botanik, dann Pharmazie bis zum Staatsexamen 1966. Es folgten je drei Monate Kandidatenzeit in der Lloyd-Apotheke und der Kronen-Apotheke in Bremerhaven.

Im Sommer 1967 nahm ich in Freiburg an einem physikalisch-chemischen Praktikum teil und begann dann mit der vorliegenden Arbeit bei Professor Dr. Dr. H. Kröger. Ich war von 1967 bis 1969 im Biochemischen Institut der Universität, Freiburg, als wissenschaftliche Hilfskraft angestellt. Seit 1969 bin ich wissenschaftlicher Angestellter im Robert Koch-Institut in Berlin.

